DISSERTATION

Molekulare Mechanismen der Octadecanoid-regulierten Indol-3-essigsäure-Biosynthese

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Biologie und Biotechnologie,
Internationale Graduiertenschule Biowissenschaften,
Ruhr-Universität Bochum

Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie

von

Mathias Hentrich

aus

Heilbad Heiligenstadt

Bochum, April 2010

DISSERTATION

Molecular Mechanisms of the Octadecanoid-regulated Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis

to obtain the degree
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
at the Faculty of Biology and Biotechnology,
International Graduate School of Biosciences,
Ruhr-University Bochum

Department of Plant Physiology

by

Mathias Hentrich

from

Heilbad Heiligenstadt, Germany

Bochum, April 2010

Meinen Eltern

und Sina

Dissertation eingereicht am: 15.04.2010

Erstgutachter: Prof. Dr. Stephan Pollmann
Zweitgutachter: Prof. Dr. Franz Narberhaus

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2010

Vorsitzender: Prof. Dr. Klaus-Peter Hoffmann
Erstprüfer: Prof. Dr. Stephan Pollmann
Zweitprüfer: Prof. Dr. Franz Narberhaus
Drittprüfer: Prof. Dr. Thomas Happe

Dekan der Fakultät: Prof. Dr. Franz Narberhaus
Vorsitzender des Promotionsausschusses: Prof. Dr. Dr. Dr. Hanns Hatt

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation mit dem Thema

„Molekulare Mechanismen
der Octadecanoid-regulierten
Indol-3-essigsäure-Biosynthese“

selbstständig verfasst, bei keiner anderen Fakultät eingereicht und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Bei digitalen Abbildungen wurde keine inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen. Die sechs eingereichten Exemplare sind in Wort und Bild identisch.

Bochum, den 15.04.2010

_____

Mathias Hentrich

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis VI

Abkürzungsverzeichnis und Nomenklatur IX

1 Einleitung 1

1.1 Auxine – pflanzliche Wachstumshormone . . . 2
1.2 YUC – Schlüsselenzyme der Auxinbiosynthese . . . 6
1.3 Octadecanoide – pflanzliche Stresshormone . . . 8
1.4 Verknüpfung von Octadecanoiden und Auxin . . . 10
1.5 Vorarbeiten und Zielsetzung dieser Arbeit . . . 10

2 Material und Methoden 14

2.1 Verwendete Geräte, Materialien und Feinchemikalien . . . 14
2.1.1 Geräte . . . 14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien . . . 16
2.1.3 Feinchemikalien . . . 17
2.2 Enzyme und Antikörper . . . 19
2.2.1 Enzyme . . . 19
2.2.2 Antikörper . . . 20
2.3 Nukleinsäuren . . . 21
2.3.1 Oligonukleotide . . . 21
2.3.2 Plasmide . . . 25
2.4 Biologisches Material . . . 27
2.4.1 Bakterien- und Hefestämme . . . 27
2.4.2 Pflanzenmaterial . . . 27
2.5 Behandlung und gentechnische Manipulation von biologischem Material 28
2.5.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien . . . 28
2.5.2 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien . . . 29
2.5.3 Anzucht von *Escherichia coli* zur heterologen Proteinexpression . 29
2.5.4 Anzucht und Lagerung von *Pichia pastoris* . . . 30
2.5.5 Transformation von Plasmid-DNA in *P. pastoris* . . . 30
2.5.6 Anzucht von *P. pastoris* zur heterologen Proteinexpression . . . 31

2.5.7 Anzucht von *Arabidopsis-thaliana*-Wurzelzellkulturen zur homologen Proteinexpression . . . 31
2.5.8 Anzucht von Pflanzen . . . 31
2.5.9 Transiente Transformation von DNA in *Nicotiana benthamiana* . . 32
2.5.10 Aufbereitung von Pflanzenmaterial zur mikroskopischen Analyse von Zellepidermis-Schichten . . . 33
2.5.11 Stabile Transformation von DNA in *A. thaliana* . . . 33
2.5.12 Biolistische Transformation von Pflanzen . . . 33
2.5.13 Induktionsbedingungen zur Transkriptanalyse von *A. thaliana* . . 34
2.5.14 Analysen zum Wurzelwachstum von *Arabidopsis*-Mutanten . . . 35
2.6 Molekularbiologische Methoden und Verfahren . . . 35
2.6.1 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren . . . 35
2.6.2 Homologe *In-vitro*-Rekombination von DNA . . . 36
2.6.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien . . . 36
2.6.4 DNA-Isolierung aus *P. pastoris* . . . 37
2.6.5 Aufarbeitung von DNA aus Pflanzen . . . 37
2.6.6 Isolierung pflanzlicher Gesamt-RNA . . . 38
2.6.7 Gewinnung von prozessierter mRNA aus Gesamt-RNA . . . 38
2.6.8 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription . . . 39
2.6.9 Polymerase-Kettenreaktion . . . 39
2.6.10 PCR zur semiquantitativen Transkriptmengenanalyse . . . 39
2.6.11 Quantitative Transkriptmengenanalyse mittels „Real-Time“-PCR 40
2.6.12 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren . . . 40
2.6.13 Quantifizierung spezifischer DNA-Sequenzen mittels radioaktiver und nichtradioaktiver Verfahren . . . 41
2.6.14 Sequenzierung doppelsträngiger DNA . . . 42
2.7 Aufarbeitung und Aufreinigung von Proteinen . . . 42
2.7.1 Gewinnung heterolog exprimierter Fusionsproteine aus *E. coli* . . 42
2.7.2 Aufarbeitung von Proteinen aus *P. pastoris* . . . 43
2.7.3 Gewinnung von Proteinrohextrakt aus transgenen Pflanzen und Wurzelzellkulturen . . . 43
2.7.4 Proteinpräzipitation mittels Methanolfällung . . . 44
2.7.5 Affinitätschromatographische Reinigung heterolog exprimierter Hexahistidin- und MBP-Fusionsproteine . . . 44

2.8 Darstellung und Nachweis von Proteinen 45
2.8.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen 45
2.8.2 Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen 45
2.8.3 Elektrophoretischer Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membran 45
2.8.4 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine 46
2.9 Untersuchung enzymatischer Aktivitäten 47
2.9.1 Analysen zur Cofaktorbindung rekombinanter Proteine mittels UV/VIS-Spektrometrie 47
2.9.2 Aktivitätsstudien von affinitätschromatographisch gereinigten Proteinen zur Bestimmung der Substratspezifität 47
2.9.3 Dünnschichtchromatographische Studien 47
2.10 GC-MS/MS-Bestimmung freier und konjugierter IES 48
2.11 Histochemischer GUS-Nachweis von Reportergenaktivitäten 49
2.12 Bestimmung der Lignifizierungsintensität 49
2.12.1 Qualitativer Ligninnachweis mittels Phloroglucin/HCl-Färbung 49
2.12.2 Gewinnung von Zellwandmaterial und quantitative Ligninbestimmung durch Thioglycolsäure-Derivatisierung 50
2.13 Makro- und mikroskopische Analysen und digitale Dokumentation . . . 50
2.14 Statistische Auswertung 51
2.15 Sequenzanalysen und Bildbearbeitung 52

3 Ergebnisse **54**
3.1 Expression, Aufreinigung und enzymatische Analysen zur Substratspezifität von YUC8 und YUC9 54
3.1.1 Überexpression von MBP-Fusionsproteinen in *Escherichia coli* . . 55
3.1.2 Heterologe Expressionsstudien in der Hefe *Pichia pastoris* 56
3.1.3 Homologe Expression in *Arabidopsis*-Wurzelzellkulturen 56
3.1.4 Dünnschichtchromatographische und photometrische Studien zur enzymatischen Aktivität 57
3.2 Spezifische Genexpression von *YUC8* und *YUC9* in *Arabidopsis thaliana* . 59
3.2.1 Quantifizierung gewebe- und entwicklungsspezifischer *YUC8*- und *YUC9*-Transkriptgehalte 59
3.2.2 *YUC8*- und *YUC9*-Transkriptveränderungen in Wildtyppflanzen und Funktionsmutanten nach Behandlung mit Induktoren 60

3.2.3 Analysen zum Einfluss weiterer Faktoren auf die Transkription von *YUC8* und *YUC9* 62
3.3 Transiente Überexpression in *Nicotiana benthamiana* 64
3.4 Genotypische Untersuchung sowie Herstellung und Selektion von *YUC8*- und *YUC9*-Funktionsmutanten 66
3.5 Phänotypische Charakterisierung von *YUC8*- und *YUC9*-Nullmutanten und -Überexpressionslinien 69
3.6 Einfluss ausgewählter Zusatzstoffe auf das Wurzelwuchsverhalten von *YUC8*- und *YUC9*-Funktionsmutanten 80
3.7 Quantifizierung von IES-Gehalten in Überexpressionspflanzen und Nullmutanten 85
3.8 Subzelluläre Lokalisation von YUC8 und YUC9 mit Hilfe von GFP-Fusionskonstrukten 89
3.9 Promotor-GUS-Reportergen-Studien 91
3.9.1 Herstellung von *YUC8*- und *YUC9*-Promotor-Reportergenlinien . 91
3.9.2 Entwicklungsabhängige *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität . . 92
3.9.3 Einfluss biotischer und abiotischer Faktoren auf die *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität 100

4 Diskussion **105**
4.1 Induktionsbedingungen der *YUC8*- und *YUC9*-Genexpression 106
4.2 Subzelluläre Lokalisation und proteinbiochemische Analysen von YUC8- und YUC9-Fusionsproteinen 114
4.3 Untersuchungen zur physiologischen Funktion von *YUC8* und *YUC9* *in planta* 121
4.4 Verknüpfung von *YUC8* und *YUC9* mit Ethylen und Tryptophan 126
4.5 Funktion von *YUC8* und *YUC9* bei der Blüten- und Fruchtentwicklung . 129
4.6 Funktion von *YUC8* und *YUC9* bei der Wurzelentwicklung 135
4.7 *YUC8*- und *YUC9*-abhängige Auxinbiosynthese 141
4.8 Fazit 143

5 Zusammenfassung **148**

6 Summary **150**

Literaturverzeichnis **152**

Anhang **184**

Veröffentlichungen **191**

Danksagung **193**

Lebenslauf **194**

Abbildungsverzeichnis

1.1 Mögliche Tryptophan-abhängige Auxin-Biosynthesewege 5
1.2 Reaktionsweg der Octadecanoid-Biosynthese *in planta* 9
1.3 Gen-Chip-Analysen der *aos/opr3*-Mutante nach Behandlung mit Octadecanoiden 11
3.1 Aufreinigung heterolog exprimierter MBP:YUC8:myc-Fusionsproteine . 55
3.2 Photometrische Analysen zur Bestimmung der FAD-Inkorporation heterolog exprimierter MBP:YUC8-Fusionsproteine 58
3.3 Dünnschichtchromatographische Analysen zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von YUC8 58
3.4 *YUC8*- und *YUC9*-Genexpression in Keimlingen und in Geweben adulter Pflanzen 60
3.5 Quantitative Transkriptanalysen von *YUC8* und *YUC9* in *aos/opr3*, *coi1* und Col-0 nach Behandlung mit Octadecanoiden und Coronatin 61
3.6 Einfluss verschiedener exogener Faktoren auf die *YUC8*- und *YUC9*-Genexpression 63
3.7 Transiente *YUC8*- und *YUC9*-Überexpression in *Nicotiana benthamiana* . . 64
3.8 Transkript- und Proteingehalte in *YUC8*ox-infiltrierten *N. benthamiana*-Blättern 66
3.9 Analyse der T-DNA-Insertionshäufigkeit von Überexpressionslinien . . 68
3.10 Phänotyp von Keimlingen und fünf Wochen alten *YUC8*ox-, *YUC9*ox- und *yuc8/yuc9*-Linien 70
3.11 Veränderte Blütenmorphologie der Überexpressionslinien 71
3.12 Schotenhabitus und vergrößertes Saatgut von *YUC8*ox und *YUC9*ox . . 72
3.13 Primärtriebe von Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp . . . 73
3.14 Abnormes Dickenwachstum der Stängel von Überexpressionslinien . . . 75
3.15 Qualitative Ligninanalysen von *YUC8*ox 76
3.16 Quantitative Ligninbestimmung nach Gabe von MeJA 78
3.17 Wurzelbehaarung bei *YUC8*- und *YUC9*-Überexpressionslinien 78
3.18 Veränderte Transkripte der *ARF*-Gene in *YUC8*ox sowie Transkriptanalysen von *YUC2* 79
3.19 Einfluss von MeJA auf das Wurzelwachstum von *YUC8*- und *YUC9*-Nullmutanten 80

3.20 Statistische Charakterisierung von *YUC8*- und *YUC9*-Funktionsmutanten im Keimlingsstadium 82
3.21 Einfluss von Zusatzstoffen auf die Wurzelentwicklung von *YUC8*ox und *YUC9*ox im Vergleich zum Wildtyp 83
3.22 Untersuchung des Wurzelgravitropismus bei Überexpression und Genverlust von *YUC8* und *YUC9* 85
3.23 Endogene IES-Gehalte in *YUC8*ox und *YUC9*ox 86
3.24 IES-Bildung in jungen Keimlingen nach MeJA-Behandlung 87
3.25 Relativer IES-Anstieg nach Induktion mit MeJA in Col-0, *yuc8*-, *yuc9*- und *yuc8/yuc9*-Nullmutanten 88
3.26 Subzelluläre Lokalisation von YUC8 und YUC9 *in planta* 89
3.27 *YUC8*- und *YUC9*-Promotor-GUS-Reportergenanalysen während der Keimlingsentwicklung 92
3.28 Histochemische Färbung sechs Wochen alter *YUC8*gus- und *YUC9*gus-Promotor-Reportergenlinien 94
3.29 Promotoraktivität von *YUC8* und *YUC9* in Wurzelspitzen und bei der Ausbildung von Seitenwurzeln 95
3.30 Histochemische GUS-Analyse von Blütenstand und Blättern in verschiedenen Promotor-Reportergenlinien 96
3.31 *YUC8*-Promotoraktivität in Knospen und Blütenorganen 97
3.32 Promotoraktivität von *YUC8* und *YUC9* während der Blüten- und Schotenentwicklung 98
3.33 Histochemische Analyse der *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität während der Samenentwicklung 100
3.34 Induktion der *YUC9*-Promotoraktivität nach Applikation verschiedener Zusätze 101
3.35 Gesteigerte *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität durch Supplementation des Wuchsmediums mit MeJA 102
3.36 Spezifische Induktion der *YUC9*-Promotoraktivität nach Verwundung . 103
4.1 Abhängigkeit der *YUC8*- und *YUC9*-Transkription von Licht, Temperatur und circadianem Rhythmus 111
4.2 Zusammenhang von Auxindosis und Auxinwirkung in Wurzeln und Sprossen 139
4.3 Molekulare Mechanismen von *YUC8* und *YUC9* in *A. thaliana* 145
6.1 Erstellung von Konstrukten zur Expression von MBP-Fusionsproteinen 184

6.2 Klonierungsstrategie für Überexpressionsstudien in *Pichia pastoris* 185
6.3 Herstellung von Konstrukten zur konstitutiven Expression von *YUC8* und *YUC9* in Pflanzen 186
6.4 Klonierungsstrategie zur Überexpression von TAP-markierten YUC8- und YUC9-Fusionsproteinen 187
6.5 Konstrukterstellung für eine induzierbare *YUC8*- und *YUC9*-Überexpression *in planta* 188
6.6 Herstellung von Konstrukten zur subzellulären Lokalisation von N- und C-terminalen GFP-Fusionsproteinen 189
6.7 Strategie zur Erstellung von Promotor-Reportergen-Konstrukten 190

Abkürzungsverzeichnis und Nomenklatur

Neben den Standardmaßeinheiten aus dem SI-System sowie den Vorsilben für dezimale Teile und Vielfache und den gängigen Abkürzungen, welche in den Regeln der „International Union for Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC) vereinbart sind, gelten folgende Abkürzungskonventionen:

35S	viraler Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus
5-MT	5-Methyltryptophan, phytotoxisches Trp-Analogon
A. tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. (Ackerschmalwand)
aacC1	Gensequenz der Gentamycin-Acetyltransferase-3-1, vermittelt Gentamycin-Resistenz
ACC	Aminocyclopropancarbonsäure
ACT2	Gensequenz von ACTIN2 (*At*3g18780)
AIB	α-Aminoisobuttersäure
Amp, Amp^r	Ampicillin, Ampicillinresistenz
AOS	Gensequenz der Allenoxidsynthase (*At*5g42650)
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
attB/P, attL/R	DNA „attachment sites“ für eine homologe Rekombination
bar	Gensequenz der Phosphinothricin-Transacetylase, vermittelt Resistenz gegen das Glufosinat-Herbizid BASTA®
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	Algorithmus für Sequenzanalysen
BMGH/BMMH	gepuffertes Hefe-Minimalmedium mit Glycerin/Methanol
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ccdB	Gensequenz einer für *E. coli* toxischen Helikase
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
coi1	Coronatin-insensitive Nullmutante (*At*2g39940)
Col-0	Ökotyp Columbia-0 (*A. thaliana*)
Col-6	Ökotyp Columbia-6 (*A. thaliana*)

CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tag („day“)
Da	Dalton (1 Da = $1{,}66 \cdot 10^{-27}$ kg)
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure („-acid“)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Einstein (1 E = 1 mol Photonen)
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
Ferri	Kaliumhexacyanidoferrat (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$)
Ferro	Kaliumhexacyanidoferrat (II) Trihydrat ($K_4[Fe(CN)_6]$)
Fg	Frischgewicht
FMN	Flavinmononukleotid
$\times$ g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9{,}81 \frac{kg \cdot m}{s^2}$)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gm, Gm^r	Gentamycin, Gentamycinresistenz
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde („hour“)
HEYNH.	HEYNHOLD
$(His)_6$	Hexahistidin
hpt	Gensequenz einer Hygromycin-Phosphotransferase, vermittelt Hygromycin-Resistenz
Hyg, Hyg^r	Hygromycin, Hygromycinresistenz
IAAld	Indol-3-acetaldehyd
IAM	Indol-3-acetamid
IAN	Indol-3-acetonitril
IAOx	Indol-3-acetaldoxim
IES	Indol-3-essigsäure
IgG	Immunglobulin G
IgG-BD	IgG-Bindedomäne
ind	Bezeichnung für β-Estradiol-induzierbar

IPA	Indol-3-pyruvat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure („-acid“)
JA-Ile	(+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-Isoleucin
Kan, Kan^r	Kanamycin, Kanamycinresistenz
KP_i	Kaliumphosphatpuffer
L.	LINNÉ
LB	Luria & Bertani, Bakteriennährmedium
M-MLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
malE	Gensequenz des Maltosebindeproteins (MBP)
MeJA	Methyljasmonsäure
MG132	Benzyloxycarbonyl-leucyl-leucyl-leucinal, Proteasom-Inhibitor
MOPS	3-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure
MBP	Maltosebindeprotein
min	Minuten
mRNA	Boten-RNA („messenger-RNA“), hier auch Poly(A)$^+$-mRNA
MS, ½MS	Murashige & Skoog-Pflanzennährmedium
myc	Peptid des menschlichen C-MYC-Proteins
N. tabacum	*Nicotiana tabacum* L.
N. benthamiana	*Nicotiana benthamiana* L.
$NADP^+$	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	reduziertes $NADP^+$
NaP_i	Natriumphosphatpuffer
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD_{600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OPDA	*cis*(+)-12-Oxophytodiensäure
OPR3	Gensequenz der OPDA-Reduktase 3 (*At*2g06050)
ox	Bezeichnung für Überexpression („overexpression“)
p	Wert des statistischen Signifikanztests
P. pastoris	*Pichia pastoris*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PCS	Protease-Schnittstelle („protease cleavage site“)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTGS	posttranskriptionelles „gene-silencing“

qPCR	quantitative PCR („Real-time PCR“)
Rif, Rif^r	Rifampicin, Rifampicinresistenz
RNA	Ribonukleinsäure („-acid“)
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SD	Standardabweichung („-deviation“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler („standard error of the mean“)
Spec, Spec^r	Spectinomycin, Spectinomycinresistenz
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer („sodium chloride sodium citrate“)
T-DNA	Transfer-DNA
T-DNA LB, RB	Insertionssequenzen der T-DNA („left/right border“)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	„Tandem-Affinity-Purification“-Anhang
TAM	Tryptamin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung („Tris buffered saline“)
TEMED	*N*,*N*,*N*′,*N*′-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton X	Octylphenol-polyethylenglycolether
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
TYM	Tyramin
uidA	Gensequenz der β-Glucuronidase (GUS)
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
var.	Varietät/Ökotyp
VIS	sichtbar („visible“)
w/v	Gewicht pro Volumen („weight/volume“)
Ws	Ökotyp Wassilewskija (*A. thaliana*)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid

X-Gluc	Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure
XVE	β-Estradiol-induzierbarer Promotor
YT, 2YT	„Yeast Extract Tryptone“, Bakteriennährmedium
YPD	„Yeast Extract Peptone Dextrose“, Hefenährmedium
YNB	„Yeast Nitrogen Base“, Hefenährmedium
YUC8	Mitglied der *YUC*-Familie in *A. thaliana* (CAA22980; 48,1 kDa; *At*YUC8; *At*4g28720)
YUC9	Mitglied der *YUC*-Familie in *A. thaliana* (AAC16744; 47,4 kDa; *At*YUC9; *At*1g04180)
Zeo, Zeo^r	Zeocin, Zeocinresistenz

Nomenklatur

Gen:	Großbuchstaben, kursiv, z.B. *YUC8*
Protein:	Großbuchstaben, z.B. YUC8
mutiertes Gen:	Kleinbuchstaben, kursiv, z.B. *yuc8*
mutiertes Protein:	Kleinbuchstaben, z.B. yuc8

Wissenschaftliche Artnamen wurden kursiv (z.B. *A. thaliana*), Autoren und Erstbeschreiber in Kapitälchen (z.B. HEYNH.) dargestellt. Anderssprachliche, im Deutschen nicht gebräuchliche Begriffe wurden mit Anführungszeichen gekennzeichnet, z.B. „floral-dip“.

1 Einleitung

Das Interesse des Menschen an seiner natürlichen Umgebung ist kein Phänomen der Neuzeit. Bereits aus der Antike ist die „Lehre vom Leben“ des griechischen Naturphilosophen Thales von Milet (600 v. Chr.) überliefert. Bis hin zum Mittelalter beruhte die Wissenschaft der Biologie (griechisch „*βίος*, *bíos*“, Leben und „*λόγος*, *lógos*“, Lehre) hauptsächlich auf Beobachtungen der Natur. Mit der Erfindung des Lichtmikroskops um 1600 und mit den Einflüssen der Chemie im 17. und 18. Jahrhundert entwickelte sich die Biologie rasant in ihren verschiedenen Teilbereichen weiter. Einer dieser Bereiche, die Botanik (griechisch „*βοτανική*, *botaniké*“ Pflanzenkunde), erforscht u.a. die Artenvielfalt, den Aufbau, das Wachstum und den Lebenszyklus von Pflanzen. Mit fortschreitender Entwicklung haben sich innerhalb der Botanik weitere Fachgebiete herausgebildet. Die Erforschung der allgemeinen Funktionsabläufe und deren (bio-)chemischen Grundlagen wird in der Pflanzenphysiologie zusammengefasst. Zur Pflanzenphysiologie wird u.a. die Untersuchung der Reaktion auf Umweltreize (Reiz- und Bewegungsphysiologie), die Erforschung intrazellulärer Stoffwechselvorgänge (Stoffwechselphysiologie) sowie die Analyse von Wachstumsprozessen und der Differenzierung von Organen (Entwicklungsphysiologie) gezählt.
Von der Keimung über die Reproduktion bis hin zum Lebensende einer Pflanze müssen diese unterschiedlichen physiologischen Entwicklungsprogramme zielgerichtet gesteuert werden. Im Gegensatz zu Tieren verfügen Pflanzen über kein zentrales Nervensystem. Die pflanzliche Koordination erfolgt ausschließlich durch chemische Signale mit Hilfe sogenannter Phytohormone (griechisch „*φυτόν*, *phytón*“, Pflanze und „*ορμόνη*, *hormáō*“, antreiben). Bei diesen Botenstoffen handelt es sich um pflanzeneigene organische Verbindungen, welche in allen höheren Pflanzen vorkommen und dort als biochemische Regulatoren fungieren. Ihnen ist gemein, dass sie bereits in sehr geringen Konzentrationen ihr Wirkungsspektrum entfalten. Im Unterschied zum tierischen Organismus können einige Phytohormone direkt in den Erzeugerzellen eine physiologische Wirkung hervorrufen [86]. Mit Hilfe von pflanzlichen Hormonen wird außerdem die Kommunikation von Pflanzen mit ihrer Außenwelt bewerkstelligt. Dies umfasst z.B. das temperatur- und lichtabhängige Wachstum, die Anlockung von Bestäubern oder die Schädlingsabwehr. Der Informationsfluss zur Steuerung der physiologischen Vorgänge innerhalb einer Pflanze erfolgt dabei über intrazellulären Transport, über die Leitungsbahnen oder über die Gasphase. Zudem wirken die pflanzlichen Hormone nicht isoliert voneinander, sondern können sich gegenseitig beeinflussen [59, 206]. Durch Induktion

oder Inhibierung spezifischer Stoffwechselwege ermöglicht erst das Zusammenspiel dieser Signalmoleküle eine exakte Koordination des pflanzlichen Lebenszyklus sowie die Reaktionen auf äußere Umweltreize [270, 326, 363]. Die fünf klassischen Phytohormongruppen umfassen die Auxine, Cytokinine, Gibberelline, Abscisinsäure und Ethylen. Es werden jedoch noch weitere Botenstoffe, wie z.B. Jasmonate bzw. Octadecanoide dazu gezählt [143, 254].

1.1 Auxine – pflanzliche Wachstumshormone

Die Charakterisierung der Phytohormonwirkung begann bereits vor mehreren hundert Jahren, als Forscher gravitrope Bewegungsformen von Wurzeln analysierten [72, 193]. Spätere Studien legten die Vermutung nahe, dass für diese Wachstumsprozesse chemische Signalstoffe verantwortlich sind [85, 328]. Zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts konnte schließlich in Pflanzen das erste pflanzliche Hormon nachgewiesen werden, welches Namensgeber für die Phytohormongruppe der Auxine (griechisch „$\alpha\acute{\upsilon}\xi\eta$, auxo“, Wachstum) ist [71, 435].
Der Hauptvertreter der Auxine, die Indol-3-essigsäure (IES) [196, 330, 391], ist essentiell für Pflanzen und insbesondere an Wachstumsprozessen beteiligt. Neben der Förderung von Streckungswachstum, Adventiv- und Seitenwurzelbildung, apikaler Dominanz und kambialer Zellteilungsaktivität werden photo- sowie gravitrope Bewegungen, Fruchtentwicklung und Seneszenz koordiniert [86, 393]. Die Wachstumsbewegungen der Pflanze werden dabei durch unterschiedliche Auxingradienten in den Geweben realisiert. Um herauszufinden, ob ein Stoff Auxinwirkung besitzt, wird die Krümmung des Organs bzw. das Wachstum nach Auxinapplikation analysiert [140, 246, 436]. Da andere Vertreter der Auxine, wie beispielsweise die Phenylessigsäure [437] oder die Indol-3-buttersäure [234], eine deutlich geringere Auxinwirkung zeigen, wird die Bezeichnung Auxin oft auch als Synonym für die IES verwendet.
Die Signaltransduktion von IES ist bereits gut aufgeklärt [87]. Bei geringen Auxingehalten wird die Transkription auxinresponsiver Gene über Aux/IAA-Repressoren („auxin/indole-3-acetic acid“) durch die Bindung an ARF-Transkriptionsfaktoren („auxin response factor“) unterdrückt [252, 408]. ARF-Faktoren binden an *cis*-Elemente auxinresponsiver Gene und modulieren die Genexpression. Steigende Auxinkonzentrationen führen zur Aktivierung der Ubiquitin-vermittelten Degradation von Aux/IAA-Proteinen und damit zur Aufhebung der Repression der ARF-Transkriptionsfaktoren. Hierfür bindet IES an auxinspezifische Rezeptoren wie das F-Box-Protein TIR1 („transport inhibitor response 1“) [92, 185], welches Teil des SCF^{TIR1}-Komplexes ist und die

Polyubiquitinierung vermittelt [186, 333]. Die Degradation der polyubiquitinierten Aux/IAA-Repressoren erfolgt anschließend durch das 26S-Proteasom, wodurch die Transkription auxinresponsiver Gene induziert wird. Neben dem Auxinrezeptor TIR1 und dessen Homologen AFB1 – AFB5 („auxin-signaling F-box protein“) in *A. thaliana* steht auch ein weiterer Auxin-Perzeptionsweg in der Diskussion. Hierbei erfolgt die Perzeption über den membranständigen Rezeptor ABP1 („auxin binding protein 1“), welcher innerhalb weniger Minuten eine Auxinantwort ermöglicht und insbesondere an der Zellelongation und Wurzelentwicklung beteiligt ist [12, 83, 352, 405].
Die Differenzierung bzw. das Wachstum von Organen wird über unterschiedliche Auxinkonzentrationen gewährleistet. Hierfür kann der zelluläre Gehalt an aktivem Auxin durch Degradation, Kompartimentierung [74] sowie durch die reversible oder irreversible Konjugation und damit Inaktivierung von freiem Auxin an Peptide [347], Zucker [173] oder Aminosäuren [307] moduliert werden. Über lokale Auxinmaxima wird die Anlage von Primordien induziert, wodurch die Phyllotaxis und Wurzelentwicklung gesteuert werden [14, 359, 421]. Die dafür erforderlichen Auxin-Konzentrationsunterschiede in den Gewebebereichen werden unter anderem durch Transportmechanismen über sogenannte PIN-Proteine („pin-formed“) realisiert [203, 291, 415]. Die für die Entwicklung notwendigen Auxin-Asymmetrien werden jedoch nicht alleine durch den Transport bewerkstelligt, sondern sind auch von der Auxinbiosynthese abhängig. So konnte gezeigt werden, dass Schlüsselenzyme der Auxinsynthese durch ihre gezielte Expression (z.B. in Kotyledonenspitzen) befähigt sind, lokale Auxinmaxima aufzubauen [65].
Im Gegensatz zu anderen Phytohormonen ist die Auxinbiosynthese, trotz der relativ einfachen Struktur und der intensiven Forschung in den letzten Jahrzehnten, bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Tryptophan (Trp) ist die wichtigste Vorstufe der pflanzlichen Auxinbiosynthese [297, 441]. Studien mit markiertem Tryptophan zeigten nur in wenigen Pflanzenspezies eine Möglichkeit zur Trp-unabhängigen Auxinsynthese, da die synthetisierte IES nur geringe Anteile an markiertem Trp aufwies [245, 279]. Zudem wurde die Möglichkeit zur Trp-unabhängigen Auxinsynthese in Tomaten beschrieben [100]. Die an der Trp-unanbhängigen IES-Synthese beteiligten Genprodukte konnten hingegen noch nicht identifiziert werden.
Hingegen sind alle bis heute analysierten Pflanzen in der Lage IES über die Trp-abhängige Auxinbiosynthese herzustellen. Hierfür wurden bereits mehrere redundant und parallel agierende Teil-Synthesewege beschrieben, welche in einigen Fällen nur unter bestimmten Voraussetzungen und beschränkt auf ausgewählte Pflanzenspezies genutzt werden [297, 378, 441]. Mittlerweile ist davon auszugehen, dass die Auxinbio-

synthese im Cytoplasma jeder Zelle und insbesondere in meristematischen Bereichen stattfindet [228, 298]. In Abbildung 1.1 ist der gegenwärtige Stand der Forschung zur Trp-abhängigen Auxinbiosynthese in Pflanzen zusammengefasst. Dargestellt sind fünf mögliche Reaktionswege, welche über Stoffwechsel-Intermediate zusätzliche Schnittstellen untereinander aufweisen. Neben dem Indol-3-pyruvat-Weg stehen der Tryptamin-Weg, der IES-Synthase-Weg, der Indol-3-acetamid-Weg sowie der Indol-3-acetaldoxim-Weg zur Diskussion.

Über den Indol-3-pyruvat-Weg (Abb. 1.1, Weg 1) erfolgt zunächst die Umwandlung von Trp mittels einer spezifischen Trp-Aminotransferase (TAA1) zu Indol-3-pyruvat (IPA) [372, 389]. Die für diesen Syntheseweg erforderliche Umsetzung von IPA zu Indol-3-acetaldehyd (IAAld) konnte bisher nur in Pflanzen-assoziierten Bakterien nachgewiesen werden [78, 195]. Die abschließende Metabolisierung von IAAld zur physiologisch aktiven IES wird durch eine Indol-3-acetaldehyd-Oxidase katalysiert [348, 350]. Mehrfach-Nullmutanten TAA1-homologer Gene zeigten durch niedrigere IES-Gehalte, eine eingeschränkte Schattenvermeidungsreaktion und wurzelspezifische Ethylen-Insensitivität zwar einen phänotypischen Einfluss, jedoch bewirkte die Überexpression von TAA1 keinen Auxin-Überproduziererphänotyp wie z.B. verlängerte Hypokotyle [372]. Eine geschwindigkeitsbestimmende Rolle als Schlüsselenzym in der Auxinbiosynthese kann daher ausgeschlossen werden.

Eine andere diskutierte Möglichkeit zur Synthese von IES ist die direkte Oxidation von Trp zu dem Intermediat Indol-3-acetaldoxim über die beiden P450-Monooxygenasen CYP79B2 und CYP79B3 (Abb. 1.1, Weg 5) [169, 247, 456]. Bisher wurden die bereits charakterisierten nachfolgenden Reaktionen jedoch nur für einige Kreuzblütengewächse beschrieben [265, 268, 296]. Da die entstehenden Produkte Indol-3-acetonitril (IAN) und Indol-Glucosinolate nur auf wenige Pflanzenfamilien beschränkt sind, kann die Rolle dieses IES-Synthesewegs eher als Ausnahme unter besonderen biotischen Einflüssen in bestimmten Pflanzenfamilien verstanden werden [294, 380].

Der direkte Reaktionsschritt von Trp zu IAM über eine Tryptophan-2-Monooxygenase (Abb. 1.1, Weg 4) ist zwar in Pflanzen-assoziierten Bakterien beschrieben worden [201], jedoch in Pflanzen noch unbekannt. Die nachfolgende Reaktion von IAM zu IES über eine Indol-3-acetamid-Hydrolase (AMI1) ist für *A. thaliana* hingegen sehr gut charakterisiert [298, 299] und auch für andere Pflanzenspezies bestätigt [216, 236]. IAM und AMI1 spielen möglicherweise auch eine Rolle bei der direkten Synthese von Trp zu IES über den IES-Synthase-Komplex (Abb. 1.1, Weg 3) [257, 300].

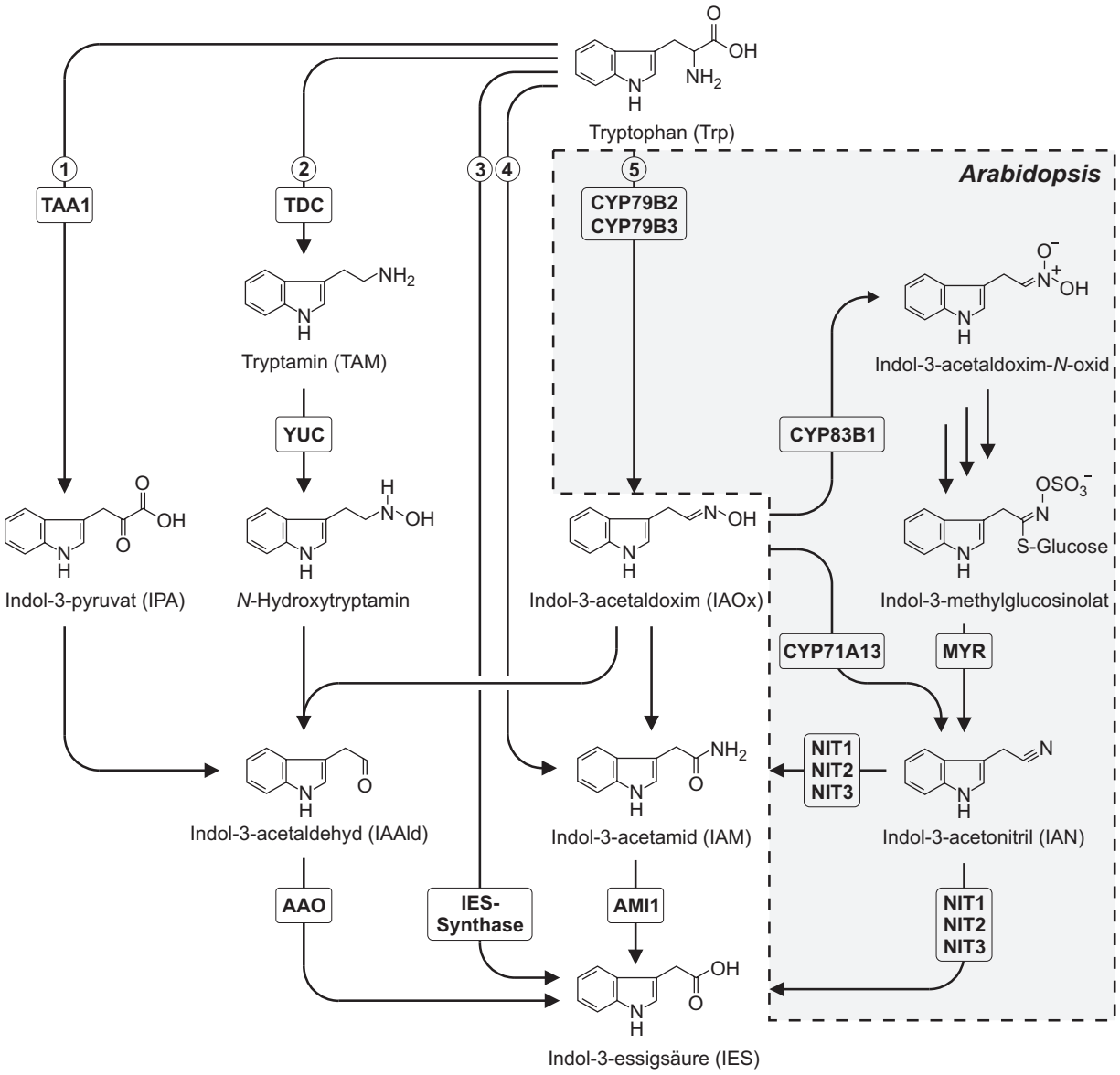


Abb. 1.1: Mögliche Tryptophan-abhängige Auxin-Biosynthesewege
Dargestellt sind die derzeit in Betracht gezogenen Möglichkeiten der pflanzlichen Auxinsynthese (1 – 5), wobei *Arabidopsis*-spezifische Reaktionen grau hinterlegt sind. Eindeutig charakterisierte Reaktionsschritte in Pflanzen sind mit den entsprechenden Proteinen in Boxen angegeben. Reaktionswege ohne angegebene Proteine sind abgeleitete Annahmen über den möglichen Syntheseweg, basierend auf beschriebenen Reaktionen in Bakterien. Die Abbildung beruht auf Daten aus POLLMANN *et al.* (2006) und ZHAO (2010) [297, 459]. [AAO - Indol-3-acetaldehyd-Oxidase, AMI1 - Indol-3-acetamid-Hydrolase, CYP - Cytochrom P450, MYR - Myrosinase, NIT - Nitrilase, TAA1 - Tryptophan-Aminotransferase, TDC - Tryptophan-Decarboxylase, YUC - Flavin-Monooxygenase-ähnliches YUCCA-Protein]

Eine weitere Möglichkeit zur Auxinbiosynthese stellt der Tryptamin-Weg dar (Abb. 1.1, Weg 2), bei dem zunächst Trp zu TAM umgewandelt werden muss. Diese Eingangsreaktion müsste durch Tryptophan-Decarboxylasen (TDC) katalysiert werden, welche bisher jedoch nur in wenigen Pflanzenspezies beschrieben wurden und eher eine Rolle bei der Alkaloidbiosynthese spielen [108, 179]. Weiterhin zeigt eine TDC-Überexpression keinen Einfluss auf den IES-Gehalt [61, 148]. Zudem wurde Tryptamin bisher nur in einigen Pflanzen nachgewiesen [305, 343], so dass eine generelle Rolle von TDC in der Auxinbiosynthese nicht bewiesen ist. Der anschließende Reaktionsschritt von TAM zu *N*-Hydroxytryptamin soll über YUCCA-Flavin-Monooxygenasen (YUC) katalysiert werden. Zwar gibt es *In-vitro*-Studien zur TAM-Substratspezifität von YUC-Mitgliedern aus *A. thaliana* [190, 455], jedoch konnte bisher kein endogenes TAM in *A. thaliana* nachgewiesen werden. Zudem wurden in diesen Studien sehr hohe Mengen an YUC:MBP-Fusionsproteinen eingesetzt, so dass nicht mit Sicherheit abgeleitet werden kann, ob TAM das physiologische *In-vivo*-Substrat von YUC ist. Weiter ungeklärt ist zudem die nachfolgende Umsetzung von *N*-Hydroxytryptamin zu IAAld. Obwohl die Auxinbiosynthese noch nicht vollständig aufgeklärt ist, zeigen Studien mit Mutanten, dass die YUC-Proteine eine entscheidende Rolle bei der Herstellung von IES spielen [63, 65]. Die genaue Positionierung der YUC-Familie in der IES-Biosynthese ist zwar bisher ungeklärt, jedoch steht außer Frage, dass YUC-Mitglieder einen essentiellen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Auxinbiosynthese katalysieren.

1.2 YUC – Schlüsselenzyme der Auxinbiosynthese

Mehrere Studien konnten einen eindeutigen Zusammenhang zwischen YUC und dem IES-Gehalt *in planta* aufzeigen. So wurde 2001 von ZHAO *et al.* eine *A.-thaliana*-Mutante mit gesteigertem Auxingehalt identifiziert [455]. Ihrem Phänotyp folgend wurde die Mutante, die durch ihre auffallende Blattmorphologie an die Yucca-Pflanze der Agavengewächse (*Yucca spec.* L.) erinnert, als *yucca* bezeichnet. Diese *YUC1*-überexprimierende Linie zeigte mit einem verlängerten Hypokotyl, epinastischen Kotyledonen sowie einem verkürzten Wurzelwachstum einen typischen Auxin-Überproduktionsphänotyp [15, 18]. Weiterhin wiesen die Mutanten eine gesteigerte Resistenz gegen das phytotoxische Tryptophan-Analogon 5-Methyltryptophan (5-MT) auf [455]. Letzteres deutet darauf hin, dass die *YUC1*-Überexpression zu einem schnelleren Umsatz von 5-MT führt und dadurch eine normalerweise toxische Wirkung vermindert wird. Daraus lässt sich schließen, dass YUC1 eine Rolle in der Trp-abhängigen Auxinbiosynthese spielt.

Im verwendeten Modellorganismus *A. thaliana* besteht die *YUC*-Familie aus elf Mitgliedern. Analysen weiterer *YUC*-Mutanten (*YUC1* – *YUC6*, *YUC10*, *YUC11*) bestätigten eine wichtige Funktion der Mitglieder im IES-Haushalt [57, 63, 65, 190, 237, 442, 457]. So weisen alle Überexpressionspflanzen der bereits charakterisierten *YUC*-Mitglieder typische Auxin-Überproduktionsphänotypen sowie einen erhöhten Auxinspiegel auf. Das Ausschalten einzelner *YUC*-Gene zeigt keinen deutlich veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp. Abnorme Phänotypen von Dreifach- und Vierfach-Nullmutanten der *YUC*-Familie zeigen jedoch, dass diese Gene redundant agieren und sich funktionell ersetzen können. Das Ausschalten von mehr als acht *YUC*-Genen führt zur Letalität der Pflanze [458]. Daraus lässt sich ableiten, dass die *YUC*-gesteuerte Auxinbiosynthese essentiell für die pflanzliche Entwicklung ist. Studien mit bereits charakterisierten *YUC*-homologen Kandidaten aus anderen Pflanzenspezies bestätigten auch dort deren essentielle Rolle an der IES-Homöostase, z.B. in *Petunia hybridae* (Petunie) [402], *Oryza sativa* (Reis) [124, 440, 447], *Solanum lycopersicum* (Tomate) [107] und *Zea mays* (Mais) [128]. Die Bedeutung der *YUC*-Genfamilien wird dadurch unterstrichen, dass in allen bisher sequenzierten Pflanzen *YUC*-homologe Gene identifiziert werden konnten [161]. Die *YUC*-Gene werden in der Pflanze nicht ubiquitär exprimiert, sondern sind durch eine präzise raum-zeitliche Regulation auf bestimmte Gewebebereiche und Entwicklungsstadien beschränkt [167]. Dabei korrelieren die Expressionsmuster deutlich mit den Entwicklungsstörungen bei *YUC*-Nullmutanten. So sind *YUC1*, *YUC4*, *YUC10* und *YUC11* innerhalb der Embryogenese an der Ausbildung des Hypokotyls und des Wurzelmeristems beteiligt [65]. Überlappend zeigt sich für *YUC1* und *YUC4* sowie zusätzlich für *YUC2* und *YUC6* eine Funktion bei der Blütenentwicklung und Musterbildung von Blattadern [63, 64]. Zudem spielen *YUC2* und *YUC6* bei der Entwicklung von Staubblättern [57] sowie *YUC4* bei der Bildung von Blattprimordien eine Rolle [63, 65]. Interessanterweise lassen sich die phänotypischen Einschränkungen der *YUC*-Nullmutanten nicht durch externe Zugabe von IES komplementieren. Hingegen führt die gewebespezifische Expression von *iaaM* unter Kontrolle des entsprechenden *YUC*-Promotors zur Komplementation des *YUC*-Nullmutanten-Phänotyps [63]. Das *iaaM*-Gen codiert für eine bakterielle Tryptophan-2-Monooxygenase, welches Trp zu IAM umsetzt und zu einer erhöhten IES-Biosynthese führt [201]. Die Beobachtung unterstreicht die Bedeutung der lokalen und zeitlich feinjustierten, *YUC*-gesteuerten Auxinbiosynthese für die pflanzliche Entwicklung.

Da sich die *YUC*-Mitglieder in ihrer biochemischen Funktion überschneiden aber unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen, deutet dies auf eine individuelle Rolle

der einzelnen *YUC*-Gene in bestimmten Entwicklungsstadien bzw. unter spezifischen Umweltbedingungen hin. Die lokale Auxinsynthese scheint eine effiziente und gezielte Steuerung von pflanzlichen Entwicklungsprozessen zu ermöglichen. Wie diese lokale *YUC*-gesteuerte Auxinbiosynthese reguliert wird, um die pflanzliche Wahrnehmung und die daraus resultierende Entwicklung zu steuern, ist hingegen noch wenig verstanden. Gen-Chip-Datenbankanalysen [167] zeigten, dass eine Reihe von exogenen Faktoren Einfluss auf die Transkription einzelner *YUC*-Mitglieder nehmen können. Als Beispiel werden *YUC8* und *YUC9* durch veränderte Lichtqualitäten [389] und bestimmte Stressfaktoren [94] stark hochreguliert. Die molekularen Mechanismen, die zur Induktion dieser Gene führen, sind jedoch unbekannt.

1.3 Octadecanoide – pflanzliche Stresshormone

Es ist bekannt, dass die pflanzliche Stressantwort über die Phytohormongruppe der Octadecanoide gesteuert wird. In höheren Pflanzen ist diese Gruppe von Phytohormonen ubiquitär verbreitet und spielt insbesondere eine Rolle bei der Herbivor- und Pathogenabwehr sowie bei der Wundreaktion [79, 242]. So reagieren Pflanzen auf biotische und abiotische Stressfaktoren unter anderem mit einem Anstieg von Octadecanoiden, welche wiederum die pflanzenspezifische Stressantwort steuern [284, 349]. Neben der Reaktion auf Krankheitserreger und Pflanzenfresser regulieren diese bioaktiven Signalmoleküle verschiedene pflanzliche Entwicklungsprozesse, wie z.B. die Pollenreifung, die Dehiszenz der Antheren sowie das Wurzelwachstum [165, 426].
Als Octadecanoide werden Verbindungen bezeichnet, welche sich von mehrfach ungesättigten C18-Fettsäuren ableiten [429]. Zu den Octadecanoiden mit nachgewiesenem Phytohormoncharakter zählen die Jasmonsäure (JA) mit ihrer physiologisch aktiven Form (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucin (JA-Ile) [119, 133] sowie der JA-Vorläufer 12-Oxophytodiensäure (OPDA) [41]. Dabei induzieren die beiden pleiotropen Wachstumsregulatoren gemeinsame und unterschiedliche Reaktionswege in der Pflanze [35, 202, 376].
Die Biosynthese von OPDA und JA ist über den Octadecanoidweg grundlegend aufgeklärt und in Abbildung 1.2 zusammengefasst [339, 407, 417]. Durch die Synthese bzw. den Metabolismus von Octadecanoiden können hunderte weiterer Gene differentiell reguliert [66, 386] und so spezifische Synthesewege von Sekundärmetaboliten aktiviert werden [34, 90, 111]. Beispielhaft genannt seien die Abwehr von Pathogenen durch Synthese von Phytoalexinen, welche antibiotische Eigenschaften besitzen [155], oder die Minderung von Herbivorattacken durch Protease-Inhibitoren [110].

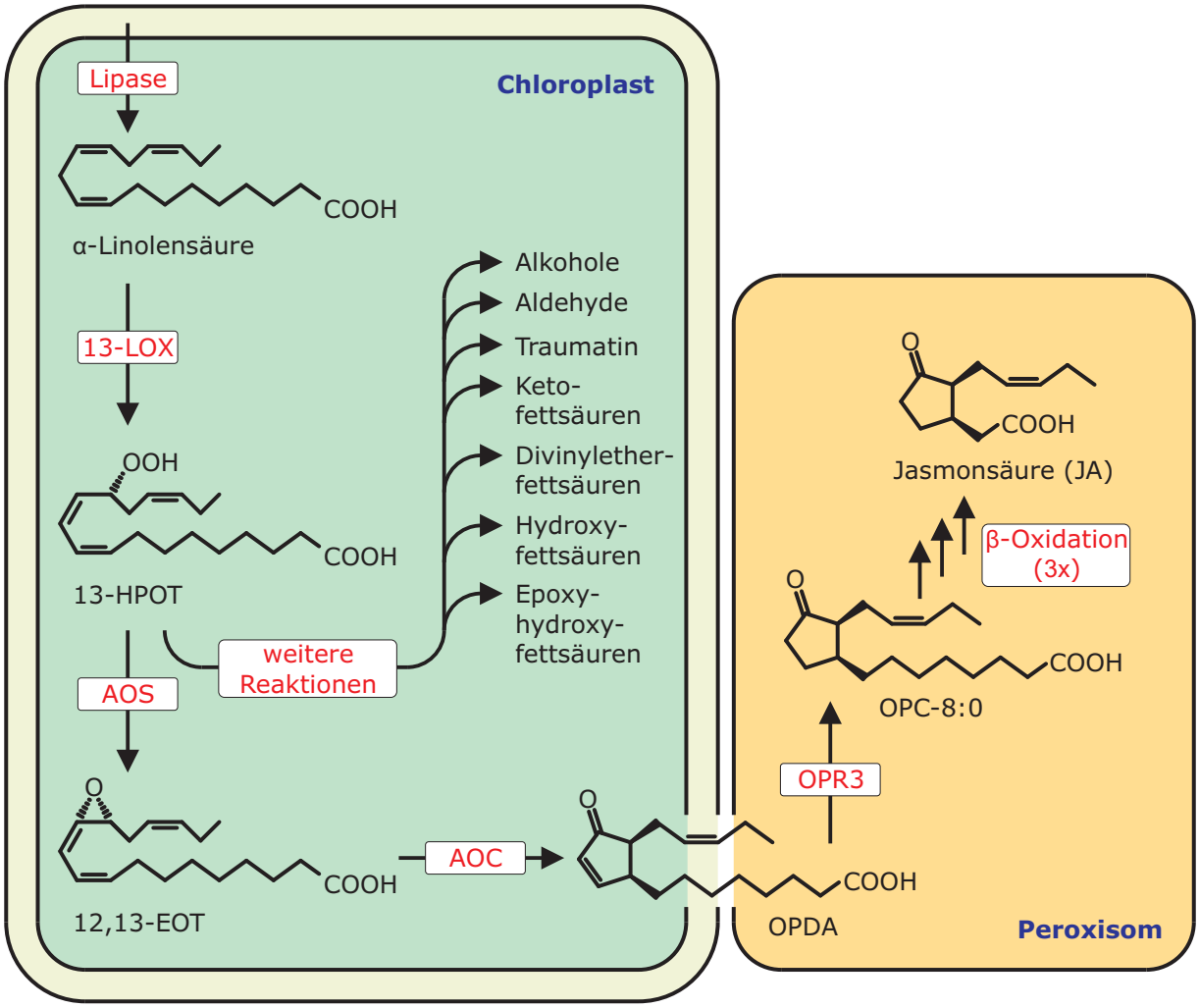


Abb. 1.2: Reaktionsweg der Octadecanoid-Biosynthese *in planta*
Gezeigt ist eine vereinfachte Darstellung der Octadecanoid-Biosynthese. Entwicklungsabhängig oder durch Stressfaktoren induziert wird als einleitender Schritt α-Linolensäure durch Aktivierung von Phospholipasen aus der Plastidenmembran freigesetzt und zu OPDA bzw. JA metabolisiert. Das Intermediat 13-HPOT kann neben der AOS-Reaktion enzymatisch zu weiteren Produkten umgesetzt werden. Die Abbildung basiert auf Daten aus WEILER (2003) und WASTERNACK (2007) [426, 431]. [13-LOX - Lipoxygenase, 13-HPOT - 13-(*S*)-Hydroperoxylinolensäure, AOS - Allenoxidsynthase, 12,13-EOT - 12,13-Epoxylinolensäure, AOC - Allenoxidzyklase, OPDA - 12-Oxophytodiensäure, OPR3 - OPDA-Reduktase, OPC-8:0 - 3-Oxo-2-(2'-[Z]-pentenyl)-zyklopentan-1-oktansäure]

1.4 Verknüpfung von Octadecanoiden und Auxin

Es konnten bereits viele Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen von Phytohormonen und deren Verknüpfung untereinander, sowohl bei Wachstums- und Entwicklungsprozessen als auch bei der Anpassung an äußere Reize, gesammelt werden [189, 374, 439]. Häufig ist hier nicht allein die absolute Konzentration entscheidend, sondern auch das Mengenverhältnis der Phytohormone zueinander. Dabei werden Überschneidungen vor allem durch gemeinsam genutzte Signaltransduktionskomponenten oder durch die direkte Modulation der Biosynthese und der entsprechenden Wirkung auf andere Phytohormone geregelt. So wird das Wirkspektrum der Auxine durch Wechselwirkung mit anderen Phytohormongruppen noch erweitert [98, 101, 320]. Auch für die Octadecanoide sind zahlreiche Wechselwirkungen berichtet worden [182, 288]. Die genaue Interaktion zwischen Octadecanoiden und Auxin ist hingegen noch wenig verstanden. Es gibt jedoch Hinweise, dass diese zwei scheinbar gegensätzlichen Gruppen von Signalmolekülen erhebliche Überlappungen aufweisen. Erste Indizien zeigten Rankenkrümmungsversuche an *Bryonia dioica* (Zaunrübe). Hier führte die Simulation einer Verwundung mittels exogener Applikation von JA neben einem Anstieg von OPDA auch zu einem erhöhten IES-Gehalt [109, 370, 432].
Sowohl für Auxin als auch für JA erfolgt die Signaltransduktion über eine Proteasom-abhängige Degradation von Repressoren [132, 252]. Studien zeigten, dass beide Phytohormongruppen die SCF-Komponenten AXR1 und AXR6 („auxin resistant“) im Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau nutzen [311] und die Auxin-insensitive Mutante *axr1* eingeschränkt auf exogen appliziertes Ethylen sowie JA reagiert [223, 398]. Bei der Blütenentwicklung und Fertilität nimmt JA in Kombination mit Auxin eine fundamentale Funktion ein [64, 170]. Dabei werden diese Entwicklungsprozesse über die auxinresponsiven ARF-Faktoren moduliert [147]. So zeigt die *arf6/arf8*-Mutante neben einer verminderten Auxinantwort Defizite in der Blütenentwicklung sowie eine reduzierte Expression von Octadecanoid-Biosynthesegenen in Blüten [266]. Die synergistische Funktion von JA und Auxin bei der pflanzlichen Pathogenabwehr [183] unterstreicht die Verknüpfung der beiden Phytohormongruppen.

1.5 Vorarbeiten und Zielsetzung dieser Arbeit

Zur genaueren Untersuchung der unterschiedlichen Induktionsfähigkeit von OPDA und JA wurden in Vorarbeiten die *A.-thaliana*-Nullmutanten *aos* [285] und *opr3* [332, 375] zu einer Doppelmutante *aos/opr3* gekreuzt [40]. Die *aos*-Mutante ist nicht befä-

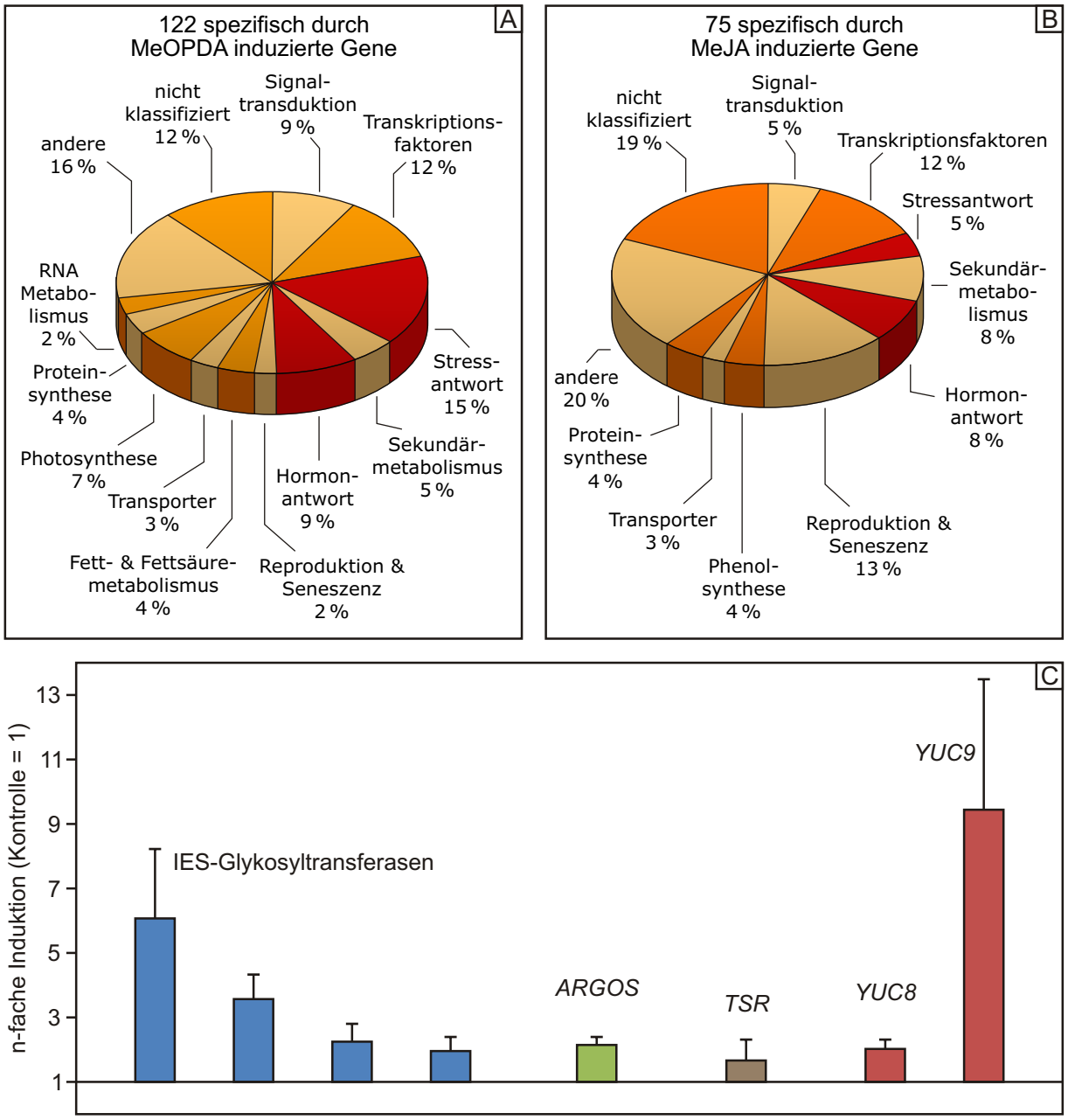


Abb. 1.3: Gen-Chip-Analysen der *aos/opr3*-Mutante nach Behandlung mit Octadecanoiden
Fünf Wochen alte *A. thaliana aos/opr3*-Pflanzen wurden mit 50 µM MeJA, 50 µM MeOPDA bzw. der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle besprüht. Nach Aufarbeitung der RNA aus den Blättern erfolgten vergleichende Gen-Chip-Transkriptanalysen. In A und B ist die Übersicht über die prozentuale Klassifizierung der induzierten Gene zu sehen. C zeigt eine Auswahl von Genen, welche direkt oder indirekt mit Auxin verknüpft sind. Die Abbildung beruht auf Daten aus BÖTTCHER (2007) [40]. [*ARGOS* - „auxin related gene involved in organ size“, *TSR* - „tryptophan synthase-related gene“]

higt, aus α-Linolensäure OPDA zu synthetisieren, kann aber OPDA zu JA umsetzen. In der *opr3*-Mutante wird zwar keine JA mehr produziert, dennoch sind die Pflanzen dazu in der Lage, OPDA zu akkumulieren. Mit Hilfe der OPDA- und JA-defizienten *aos/opr3*-Doppelmutante waren erstmals entkoppelte Analysen von OPDA- bzw. JA-abhängigen Genregulationsprozessen möglich. Hierfür wurden differentielle Studien mittels Affymetrix ATH1-Gen-Chips („Microarrays“) durchgeführt, womit eine simultane Untersuchung von etwa 24 000 Genen und damit über 90 % des *Arabidopsis*-Genoms ermöglicht wurde. So wurden in der der *aos/opr3*-Doppelmutante nach Behandlung mit Methyljasmonsäure (MeJA) bzw. Methyl-OPDA (MeOPDA) knapp zweihundert Gene spezifisch hochreguliert (Abb. 1.3 A und B) [40].
Interessanterweise zeigte sich unter den Daten eine Hochregulation von Genen, welche direkt oder indirekt mit Auxin in Verbindung stehen (Abb. 1.3 C). Beispielsweise wurden IES-Glykosyltransferasen induziert, welche die Auxinwirkung bzw. Auxinhomöostase beeinflussen [136, 145]. Mit *ARGOS* („auxin related gene involved in organ size“) wurde ein IES-induzierbares *Arabidopsis*-Gen identifiziert, welches für ein an Wachstumsprozessen beteiligtes Regulatorprotein codiert [168]. Homologe von *TSR* („tryptophan synthase-related gene“) sind in der Trp-Biosynthese involviert [27]. Trp dient wiederum als Ausgangssubstrat in der Auxinbiosynthese, worin YUC-Proteine einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysieren (Abb. 1.1). Die Studien mit der *aos/opr3*-Nullmutante und die Gen-Chip-Analysen anderer Arbeitsgruppen [256, 386] zeigen, dass die Gabe von Octadecanoiden zu einer Induktion auxinresponsiver Gene führt.
Für diese Arbeit von besonderer Bedeutung war die spezifische Hochregulation von *YUC8* und *YUC9* in der Octadecanoid-behandelten *aos/opr3*-Doppelmutante (Abb. 1.3 C). Aufgrund der Homologie der bisher uncharakterisierten Mitglieder *YUC8* und *YUC9* zu den bereits beschriebenen *YUC*-Isogenen sind beide womöglich an der Auxinsynthese beteiligt. Dies war der erste Hinweis auf eine möglicherweise *YUC*-abhängige Verknüpfung zweier Phytohormongruppen. Interessanterweise wurde eine Octadecanoid-abhängige Induktion eines anderen Phytohormon-Biosynthesewegs bisher noch nicht beschrieben. Die molekularen Hintergründe zur Verknüpfung von Octadecanoiden und Auxinen über *YUC8* und *YUC9* sind daher von besonderem Interesse.
In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Octadecanoid-abhängige Auxinbiosynthese in *A. thaliana* über *YUC8* und *YUC9* realisiert wird. Dies könnte die Koordination von Entwicklungsprozessen ermöglichen oder als Antwort auf Stressbedingungen dienen. Für eine Charakterisierung von *YUC8* und *YUC9* sollten Studien

mit Überexpressions- und Nullmutanten Aufschluss über deren physiologische Funktion geben. Zudem war es das Ziel, die Eigenschaften von *YUC8* und *YUC9*, sowohl hinsichtlich der pflanzlichen Entwicklung als auch deren Reaktionen auf wechselnde Umgebungsparameter, mit Hilfe phänotypischer Untersuchungen, Inhaltsstoffanalysen und entsprechenden Promotor-Reportergenlinien näher zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte, Materialien und Feinchemikalien

2.1.1 Geräte

Autoklaven	
Autoklav Typ 23	Melag, Berlin
Vapoklav Typ 500	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Bio-Imager FLA 3000,	
BAS-MP 2040 S Image Plates	Fujifilm, Düsseldorf
Brutschrank Memmert UM 660	Memmert, Schwabach
Digitalkameras	
Nikon Coolpix 990	Nikon, Düsseldorf
Nikon D200	Nikon, Düsseldorf
Sony DSC-P200	Sony, München
Elektroporationsgeräte	
Capacitance Extender II	Bio-Rad, München
Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Pulse Controller II	Bio-Rad, München
Flüssigszintillationszähler	
Tri-Carb 2800 TR	PerkinElmer, Waltham, USA
GC-MS/MS-System	
Gaschromatograph CP-3800	Varian, Darmstadt
Massenspektrometer Saturn 2000	Varian, Darmstadt
Probengeber CombiPAL	CTC Analytics, Zwingen, Schweiz
Geldokumentation	
Image Capture Computer CS1	Cybertech, Berlin
Video Copy Processor P67E	Mitsubishi Electric, Tokyo, Japan
Gelelektrophoresezubehör	
Elektrotransferkammer Hoefer TE22	GE Healthcare Europe, München
Geltrockner SGD 4050	Savant, München
Glasplatten und Zubehör	Biometra, Göttingen
Kämme, Elektrophoresekammern	Werkstätten, Ruhr-Universität Bochum
Hybridisierungsofen OV1	Biometra, Göttingen
Inkubationsschüttler Modell G25	New Brunswick Scientific, Edison, USA

Schwingmühle Mixer Mill MM 300	Qiagen, Hilden
Mikroskope	
Leica MZ12	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
LM Digital SLR Adapter	Micro Tech Lab, Graz, Österreich
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 100	Zeiss, Jena
AxioCam MRc	Zeiss, Jena
Konfokales Lasermikroskop	
LSM 510 META	Zeiss, Jena
Mixer Waring Blender	Waring, Torrington, USA
Netzgeräte	
Electrophoresis Power Supply EPS 200	Amersham Biosciences, Freiburg
Power Pak 300	Bio-Rad, München
PS 304 Power Supply	Gibco BRL, Neu-Isenburg
Partikelkanone	
Particle Inflow Gun (PIG)	Werkstätten, Universität Freiburg
Vakuumpumpe Divac 2.4L	LH Leybold, Köln
Steuergerät Divatronic DT1	LH Leybold, Köln
PCR-Thermoblöcke	
GeneAmp PCR System 9700A	Applied Biosystems, Darmstadt
Real-Time DNA Engine Opticon® 2	MJ Research, Waltham, USA
Peristaltikpumpe P1	GE Healthcare Europe, München
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer	
DU-7000	Beckman, München
ELISA Easyreader EAR 400 AT	SLT Laborinstrumente, Overath
GeneQuant II	Amersham Biosciences, Freiburg
Nanodrop ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Novaspec II	Amersham Biosciences, Freiburg
Uvikon 933	Kontron Instruments, Echingen
Scanner Medion MD 41985	Medion, Essen
Sprühfinger	Werkstätten, Ruhr-Universität Bochum
Sterilbänke	
danLAV VFR 1206 GS	Claus Damm, Humlebaek, Dänemark
Gelaire BSB 3	Flow Laboratories, Meckenheim
Trockenschrank WTB Binder	WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen

Ultraschallgeräte	
Sonifier B-17	Branson, Branbury, USA
Sonorex RK 510 S	Bandelin, Berlin
UV-Crosslinker Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
UV-Handlampe NU-8-KL	Benda, Wiesloch
Waagen	
Faust FA1500-2	Faust, Schaffhausen
Kern 770	Kern, Bahlingen-Frommern
Wasserbäder	
MT Lauda	Lauda Dr. Wobser, Lauda-Königshofen
RM6 Lauda	Lauda Dr. Wobser, Lauda-Königshofen
Zentrifugen und Zubehör	
Biofuge 13	Heraeus, Newport Pagnell, UK
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Sigma 1K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode/Harz
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B plus	DuPont, Bad Homburg
Rotoren: SS34, GSA	Kontron, Neufahrn
Mini-Zentrifuge Spectrafuge®	NeoLab, Heidelberg
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge OTD Kombi	Du Pont, Bad Homburg

Alle weiteren Geräte entsprachen dem allgemeinen Laborstandard.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Chromatographiematrizes	
Amylose-Matrix	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Nitrilotriessigsäure-Agarose	
Ni^{2+}-beladen (Ni^{2+}-NTA)	Qiagen, Hilden
PD-10 Entsalzungssäulen	GE Healthcare Europe, München
Sephadex® G-50	Sigma, München
DIG Easy Hyb Granules	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
GC-Säule ZB-50 (30 m, ø 0,25 mm, 0,25 µm)	Phenomenex, Aschaffenburg
Glasperlen, 425 – 600 µm	Sigma, München
Goldpartikel, ø 1 µm	Bio-Rad, München

NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey & Nagel, Düren
Oligotex Direct mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Polygram® SIL G/UV_{254} DC-Fertigplatten	Macherey & Nagel, Düren
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuantiFast™SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Sterilfilter, Porengröße 0,22 µm	Millipore, Eschborn
Transfer-Zubehör	
Gel-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrocellulose-Membran BA85, 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Nytran SuPerCharge Nylonmembran	Schleicher & Schuell, Dassel

Nicht aufgeführte Verbrauchsmaterialien entsprachen dem üblichen Laborstandard.

2.1.3 Feinchemikalien

Acetosyringon	Sigma, München
Acrylamidlösung	Bio-Rad, München; Serva, Heidelberg
Agarose	Gibco BRL, Neu-Isenburg
Alkalilignin	Sigma, München
Antibiotika	
Ampicillin	Biomol, Hamburg
Gentamycin	Duchefa, Haarlem, NL
Hygromycin	Sigma, München
Kanamycin	Sigma, München
Rifampicin	Duchefa, Haarlem, NL
Spectinomycin	Duchefa, Haarlem, NL
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma, München
β-Mercaptoethanol	Sigma, München
β-Estradiol	Sigma, München
Bacto-Agar, -Hefeextrakt, -Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
BASTA®	Aventis, Hattersheim
BCIP	Biomol, Hamburg
Biotin	Sigma, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg

Chloralhydrat	Sigma, München
Coronatin	Lehrstuhlbestand
CTAB	AppliChem, Darmstadt
Diazomethan	Lehrstuhlbestand
dNTPs	Finnzymes, Espoo, Finnland
[α-^{32}P]-dATP (0,37 MBq/µl)	Amersham Biosciences, Freiburg
DTT	Biomol, Hamburg
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Entwickler	Tetenal, Norderstedt
Ethidiumbromid	Sigma, München
FAD	Sigma, München
Fixierer	Tetenal, Norderstedt
FMN	Sigma, München
Gelelektrophoresemarker	
1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Molekulargewichtsmarker LMW	GE Healthcare Europe, München
Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad, München
Gelrite	Nordwald, Schweizerhall
Imidazol	Sigma, München
Indol-3-acetamid	Sigma, München
Indol-3-essigsäure	Sigma, München
[^{2}H]$_2$-Indol-3-essigsäure	Isotec, Fort Myers, USA
[^{13}C]$_6$-Indol-3-essigsäure	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
Indol-3-pyruvat	Sigma, München
IPTG	Biomol, Hamburg
Methyljasmonsäure	Bedoukain Research, Danbury, USA
MG132	Calbiochem, San Diego, USA
MS Medium, MS Vitamin-Mix	Duchefa, Haarlem, NL
MOPS	Sigma, München
NADP$^+$, NADPH	Sigma, München
NBT	AppliChem, Darmstadt
Ninhydrin	Sigma, München
Oligo-d(T)$_{18}$-Starteroligonukleotide	Promega, Mannheim
OPDA	Lehrstuhlbestand

Phloroglucin	Merck, Darmstadt
Phyto-Agar	Duchefa, Haarlem, NL
Ponceau-S	Sigma, München
Proteaseinhibitoren	
Aprotinin	Sigma, München
Benzamidin	Sigma, München
Complete Protease-Inhibitor-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Leupeptin	Sigma, München
Pepstatin A	Sigma, München
PMSF	Sigma, München
Proteinpulver „PowerPlay“	Novartis, München
SDS	Serva, Heidelberg
Serva Coomassie-Blau G 250, R 250	Serva, Heidelberg
Silwet L-77®	Lehle Seeds, Round Rock, USA
Spermidin	Sigma, München
SuperSignal West Pico, Femto	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Sigma, München
Thioglycolsäure	Sigma, München
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, München
Trizol®	Invitrogen, Karlsruhe
Tryptophan	Sigma, München
Tryptamin	Sigma, München
Tween 20	Sigma, München
X-Gal	Biomol, Hamburg
X-Gluc	Duchefa, Haarlem, NL
YPD-Medium, YPD-Agar, YNB	Invitrogen, Karlsruhe

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden in Analyse-Qualität von den Firmen AppliChem, Biomol, Gibco BRL, Roche Diagnostics, Riedel-de-Haën, Serva und Sigma bezogen.

2.2 Enzyme und Antikörper

2.2.1 Enzyme

DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot
Gateway™ BP Clonase® II Mix	Invitrogen, Karlsruhe

Gateway™ LR Clonase® II Mix	Invitrogen, Karlsruhe
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
iProof™ HF DNA-Polymerase	Bio-Rad, München
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Promega, Mannheim
Lysozym	Sigma, München
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Pfu DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M.; Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
RNasin	Promega, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim
Taq-Polymerase-Kit DyNAzyme	Finnzymes, Espoo, Finnland

Benötigte Puffer wurden von den oben genannten Firmen bezogen und den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

2.2.2 Antikörper

Name	Antigen	Herkunft	Verdünnung
anti-myc, monoklonal, Maus-IgG	c-myc-Epitop (EQKLISEEDLN)	Lehrstuhlbestand	65 mg/l
anti-His, monoklonal, Maus-IgG	$(His)_5$-Epitop	Novagen, Madison, USA	1 : 5000
anti-MBP, polyklonal, Kaninchen-IgG	MBP-Epitop	New England Biolabs, Frankfurt a.M.	1 : 5000
anti-YUC1, Kaninchenserum (643)	denaturiertes YUC1	[296]	1 : 1000
Ziege-anti-Kaninchen-IgG an alkalische Phosphatase gekoppelt	F_c-Abschnitte von Kaninchen-Immunglobulinen	Promega, Mannheim	1 : 10 000

Ziege-anti-Maus-IgG an alkalische Phosphatase gekoppelt	leichte und schwere Kette von Maus-Immunglobulinen	Promega, Mannheim	1 : 10 000
Ziege-anti-Maus-IgG an Meerrettichperoxidase gekoppelt	leichte und schwere Kette von Maus-Immunglobulinen	Pierce, Rockford, USA	1 : 10 000

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Firmen Invitrogen bzw. Sigma synthetisiert. Bindestellen für Restriktionsendonukleasen bzw. attB1/attB2-Rekombinationssequenzen sind im Namen angegeben und in der Sequenz unterstrichen dargestellt. Die Abkürzungen der Nukleinsäuren entsprechen der IUPAC-Nomenklatur.

Bezeichnung	Sequenz (5′ nach 3′)
Klonierungen	
pTrcHis2-myc-PstI-Rev (P391)	TATCTGCAGTCAATTCAGATCCTCTTCTGAGATG
YUC8-attB1-For (P422)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATGGAGA ATATGTTTCGTTTGATGG
YUC8-attB2-Rev (P393)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAGAACT GTTGAGAGATACAC
YUC8-myc-KpnI-For (P330)	TATGGTACCATGGAGAATATGTTTCGTTTG
YUC8-myc-Stop-NotI-Rev (P331)	TATGCGGCCGCTCAATTCAGATCCTCTTCTGAG
YUC8-myc-BamHI-TT-For (P332)	TATGGATCCTTATGGAGAATATGTTTCGTTTG
YUC8-pMAL-BamHI-For (P390)	TATGGATCCATGGAGAATATGTTTCGTTTG
YUC8-pPICZ-EcoRI-For (P577)	TATGAATTCATGGAGAATATGTTTCGTTTG
YUC8-pPICZ-NotI-Rev (P578)	TATGCGGCCGCGAACTGTTGAGAGATACACC
YUC8-Prom-KpnI-For (P498)	TATGGTACCGTTCTGCTCACCAACGCATATATAAG
YUC8-Prom-SmaI-Rev (P499)	TATCCCGGGACAAACGAAACATATTCTCCATTCTTTT TTTATAAG
YUC8-Prom-Seq-600 (P500)	TCCCAAAGTGCTTAATATTCAAC
YUC8-Prom-Seq-1200 (P501)	GTCACCATCACTTGGCTAGC

YUC8-Prom-Seq-1800 (P502)	GTGCAGCGTCTACCAAAAAAAAG
YUC8-Prom-Seq-2400 (P503)	GCTTACCTTCCTCATCCTCTC
YUC8-SpeI-For (P526)	TATACTAGTATGGAGAATATGTTTCGTTTG
YUC8-Stop-KpnI-Rev (P527)	TATGGTACCTTAGAACTGTTGAGAGATACACC
YUC9-attB1-For (P423)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATGGAGA ATATGTTTAGACTCATGG
YUC9-attB2-Rev (P268)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAAGCA ACTGAGATGCATCTTC
YUC9-myc-KpnI-For (P494)	TATGGTACCATGGAGAATATGTTTAGACTCATG
YUC9-myc-Stop-NotI-Rev (P495)	TATGCGGCCGCTCAATTCAGATCCTCTTCTGAG
YUC9-pMAL-BamHI-For (P389)	TATGGATCCATGGAGAATATGTTTAGACTC
YUC9-pPICZ-EcoRI-For (P579)	TATGAATTCATGGAGAATATGTTTAGACTC
YUC9-pPICZ-NotI-Rev (P580)	TATGCGGCCGCAGCAACTGAGATGCATCTTC
YUC9-Prom-KpnI-For (P496)	TATGGTACCAATCCCACTAGAACTCTATTTTACAAG
YUC9-Prom-SmaI-Rev (P497)	TATCCCGGGAGAGTCTAAACATATTCTCCATTTTCTTG
YUC9-Prom-Seq-600 (P504)	CAACGGAATTCACTAGCACGATC
YUC9-Prom-Seq-1200 (P505)	GAGGAATTCTACGAGTTTCTAG
YUC9-Prom-Seq-1800 (P506)	CAATGATTGAATTAACTCGGAGA
YUC9-Prom-Seq-2400 (P507)	TGGTACTGGACCATACGATC
YUC9-SpeI-For (P528)	TATACTAGTATGGAGAATATGTTTAGACTC
YUC9-Stop-KpnI-Rev (P529)	TATGGTACCTTAAGCAACTGAGATGCATCTTC
Expressionsanalysen	
AOS-RT-For (P510)	AGAGTCAACATGCCACCGGGA
AOS-RT-Rev (P511)	TCATCCCACCCCACGTGTTG
AOS-qPCR-For (P508)	TCCGCCGGTGAGATTCTCGTT
AOS-qPCR-Rev (P509)	CGCCCGCCCGATACGTTTAA
ARF1-RT-For (P542)	TGTGCTGGACCTCTTGTAACC
ARF1-RT-Rev (P543)	GTTGCAAGGACCCCAATATG
ARF2-RT-For (P544)	GTTCCAGGTGCATTCGTTCT
ARF2-RT-Rev (P545)	CGAAGAGTCAGGAGATGAAGG
ARF6-RT-For (P546)	GCTGCTTCGACCAACAAAG

ARF6-RT-Rev (P547)	GCATCCTAAACCGCATACCA
ARF8-RT-For (P548)	TTACCCAAGCCTACCACCAC
ARF8-RT-Rev (P549)	GCATCCCAACTGAAATACGC
VSP1-RT-For (P493)	TTCCCAACGATGTTGTACCC
VSP1-RT-Rev (P492)	CCTCGAATCGAACACCATCT
VSP1-qPCR-For (P491)	TTTTACGCCAAAGGACTTGC
VSP1-qPCR-Rev (P490)	TGGAGTTGATTCTCCGGACT
YUC1-qPCR-For (P400)	AAATGTCACCGGCAAAAGTC
YUC1-qPCR-Rev (P401)	GCACGTTGCTTTTGTAACCA
YUC2-qPCR-For (P402)	TCCGAAGTGGACACATCAAG
YUC2-qPCR-Rev (P403)	TGCGGAAATCCATCTTTCTC
YUC3-qPCR-For (P404)	GATGGCCGTGTTCTTGAGAT
YUC3-qPCR-Rev (P405)	CGCACCAAACAATCCTTTTC
YUC4-qPCR-For (P424)	TTCCGAACATACCCGGTTTA
YUC4-qPCR-Rev (P425)	ACGACCATATGAGGCAGAGC
YUC5-qPCR-For (P408)	GCGGAGAAAGTTGTTCCAGA
YUC5-qPCR-Rev (P409)	CCATGGATGCATTAGCATTG
YUC6-qPCR-For (P410)	ATCTCTGCAACTTCGGTGCT
YUC6-qPCR-Rev (P411)	AGTATCCCCGAGGATGAACC
YUC7-qPCR-For (P412)	TGGTCGAGTTCTGCAGATTG
YUC7-qPCR-Rev (P413)	ACGATGCACCTGAGAGTCCT
YUC8-RT-For (P562)	AGTGATGCCGGAGATTGATGGTCT
YUC8-RT-Rev (P563)	TCCTCGTAAACCCAACCGCATACA
YUC8-qPCR-For (P615)	CGTCTCAAGCTTCACCTTCC
YUC8-qPCR-Rev (P616)	AGCCACTGGTCTCATCGAAC
YUC9-RT-For (P564)	AAGTCCGGCGAGAAATTCAGAGGA
YUC9-RT-Rev (P565)	TACTGATGCTCCAGCCAACCCTTT
YUC9-qPCR-For (P416)	GACGGAGTTTGACGGAGAAG
YUC9-qPCR-Rev (P417)	CCCTCGGTAAAACATGAACC
YUC10-qPCR-For (P426)	TGGTGACGACTATGGCAAAA
YUC10-qPCR-Rev (P427)	CTTCCAATCCCACCATTGAT

YUC11-qPCR-For (P420)	GTGCAACGCTAATGTCTCCA
YUC11-qPCR-Rev (P421)	TGGGCCATTATTGGGTCTTA
Expressionsanalysen, Referenzgene	
ACT2-RT-For (P81)	GTCGCCATCCAAGCTGTTCT
ACT2-RT-Rev (P82)	CTGCCTCATCATACTCGGCC
ACT2-qPCR-For (P394)	GGCTCCTCTTAACCCAAAGG
ACT2-qPCR-Rev (P395)	ACCCTCGTAGATTGGCACAG
APT1-RT-For (P514)	ATGCAAACAATAATAATTTCTCCACTTGTT
APT1-RT-Rev (P515)	TTAAGCAGCCGACTTTACAAGAACAAAT
APT1-qPCR-For (P512)	TCGTGCTGTTCCTTGCAACCG
APT1-qPCR-Rev (P513)	GCGGAGGAGAAGAGGCGGAGT
EF-1a-qPCR-For (P396)	CTTGCTTTCACCCTTGGTGT
EF-1a-qPCR-Rev (P397)	TCCCTCGAATCCAGAGATTG
EIF4A1-qPCR-For (P398)	GGCGTGTCTTTGACATGTTG
EIF4A1-qPCR-Rev (P399)	AGAGCTTCTGGTGGCATTGT
PDF2-RT-For (P518)	GGGTTGTGCTGCTCTTGGGAA
PDF2-RT-Rev (P519)	TGCAGCAGCTTCACGGATTGA
PDF2-qPCR-For (P516)	GATGACATGCCAATGGTGCGC
PDF2-qPCR-Rev (P517)	CAGCACAACCCTCAACAGCCA
UBQ10-RT-For (P522)	ATGCAGATCTTTGTTAAGACTCTC
UBQ10-RT-Rev (P523)	CACGAAGATCTGCATACCTCC
UBQ10-qPCR-For (P520)	TTGGAGGATGGCAGAACTCTTGCT
UBQ10-qPCR-Rev (P521)	AGTTTTCCCAGTCAACGTCTTAACGAAA
Sondenherstellung	
pROK-Sonde-For (P345)	CACAGATGGTTAGAGAGGCTTAC
pROK-Sonde-Rev (P346)	TGCGAAGGATAGTGGGATTGT
BAR-Sonde-For (P530)	GTCGACCGTGTACGTCTCC
BAR-Sonde-Rev (P531)	GATCTCGGTGACGGGCAG
NPTII-Sonde-For (P532)	CGAAGAACTCCAGCATGAGA
NPTII-Sonde-Rev (P533)	GCTATGACTGGGCACAACAG

2.3.2 Plasmide

Die während der experimentellen Arbeit genutzten und erstellten Plasmide sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Plasmide, die in den jeweiligen Klonierungen bzw. Experimenten verwendet wurden, sind entsprechend sortiert und zusammen aufgeführt.

Bezeichnung	Referenz
pBS-SK+ (010)	Stratagene, Heidelberg [353]
pTrc-YUC8 (015)	[161]
pTrc-YUC9 (045)	[161]
pBS-BamHI-YUC8-myc-PstI (047)	diese Arbeit (Abb. 6.1)
pBS-BamHI-YUC9-myc-PstI (049)	diese Arbeit (Abb. 6.1)
pMAL-c2x (050)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
pMAL-p2x (051)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
pMAL-c2x-YUC8-myc (052)	diese Arbeit (Abb. 6.1)
pMAL-p2x-YUC8-myc (053)	diese Arbeit (Abb. 6.1)
pMAL-c2x-YUC9-myc (054)	diese Arbeit (Abb. 6.1)
pMAL-p2x-YUC9-myc (055)	diese Arbeit (Abb. 6.1)
pPICZα-A (118)	Invitrogen, Karlsruhe
pBS-EcoRI-YUC8-NotI (119)	diese Arbeit (Abb. 6.2)
pBS-EcoRI-YUC9-NotI (120)	diese Arbeit (Abb. 6.2)
pPICZα-A-YUC8 (121)	diese Arbeit (Abb. 6.2)
pPICZα-A-YUC9 (122)	diese Arbeit (Abb. 6.2)
pPICZ-B (130)	Invitrogen, Karlsruhe
pPICZ-B-YUC8 (126)	diese Arbeit (Abb. 6.2)
pPICZ-B-YUC9 (127)	diese Arbeit (Abb. 6.2)
pBS-YUC8 (013)	[161]
pBS-YUC9 (012)	[161]
pDONR221 (061)	Invitrogen, Karlsruhe
pENTRY-YUC8 (064)	diese Arbeit (Abb. 6.4)
pENTRY-YUC9 (065)	diese Arbeit (Abb. 6.4)
pN-TAPa (042)	[325]
pN-TAP-YUC8 (066)	diese Arbeit (Abb. 6.4)
pN-TAP-YUC9 (067)	diese Arbeit (Abb. 6.4)

pBin61-p19 (038)	[422]
pBS-BamHI-YUC8-myc-NotI (022)	[161]
pENTR1A (029)	Invitrogen, Karlsruhe
pENTR1A-YUC8-myc (031)	[161]
pENTR1A-YUC9-myc (075)	diese Arbeit (Abb. 6.5)
pER8	[460]
pER8-GAT (040)	S. Pollmann (unveröffentlicht)
pER8G-YUC8-myc (041)	[161]
pER8G-YUC9-myc (076)	diese Arbeit (Abb. 6.5)
pMH018-ENTR1-35S (018)	[161]
pENTR1-35S-YUC8-myc (025)	[161]
pENTR1-35S-YUC9-myc (071)	diese Arbeit (Abb. 6.3)
pSP-DEST1.1 (026)	S. Pollmann (unveröffentlicht)
pD1-35S-YUC8-myc (027)	[161]
pD1-35S-YUC9-myc (072)	diese Arbeit (Abb. 6.3)
pUC-GFP-N (077)	S. Pollmann (unveröffentlicht)
pUC-GFP-C (078)	S. Pollmann (unveröffentlicht)
p35S-YUC8-GFP (082)	diese Arbeit (Abb. 6.6)
p35S-YUC9-GFP (083)	diese Arbeit (Abb. 6.6)
pBS-SpeI-YUC8-KpnI (095)	diese Arbeit (Abb. 6.6)
pBS-SpeI-YUC9-KpnI (097)	diese Arbeit (Abb. 6.6)
p35S-GFP-YUC8 (098)	diese Arbeit (Abb. 6.6)
p35S-GFP-YUC9 (099)	diese Arbeit (Abb. 6.6)
pSP-ENTR2-GUS (089)	S. Pollmann (unveröffentlicht)
pENTR-Y8Prom3kb-GUS (091)	diese Arbeit (Abb. 6.7)
pENTR-Y9Prom3kb-GUS (090)	diese Arbeit (Abb. 6.7)
pD1-YUC8Prom3kb-GUS (093)	diese Arbeit (Abb. 6.7)
pD1-YUC9Prom3kb-GUS (092)	diese Arbeit (Abb. 6.7)

2.4 Biologisches Material

2.4.1 Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
E. coli TOP10	F^-, *mcr*A, Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), ϕ80*lac*ZΔM15, Δ*lac*X74, *rec*A1, *ara*D139, Δ(*ara-leu*)7697, *gal*U, *gal*K, *rps*L(Str^R), *end*A1, *nup*G	Invitrogen, [142]
E. coli K12 TB1	F^-, *ara*, Δ(*lac-proAB*), ϕ80*lac*ZΔM15, *rps*L(Str^R), *thi*, *hsd*R	[451]
E. coli XL-1 Blue	*rec*A1, *rel*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *hsd*R17 (r_k^-, m_k^+), *sup*E44, λ^-, *lac*[F', *pro*AB, $lacI^qZ\Delta M15$, Tn10 (*Tet*^{r})]	[51]
E. coli DB3.1	F^-, *gyr*A462, *end*A1, *gln*V44, Δ(*sr*1-*rec*A), *mcr*B, *mrr*, *hsd*S20(r_B^-, m_B^-), *ara*14, *gal*K2, *lac*Y1, *pro*A2, *rps*L20(Sm^r), *xyl*5, Δ*leu*, *mtl*1	Invitrogen, [28]
A. tumefaciens C58C1 [pMP90]	chromosomal Rif^r; Helferplasmid pMP90 (pTiBo542ΔT-DNA) Gm^r	[197]
A. tumefaciens GV3101 [pMP90]	chromosomal Rif^r; Helferplasmid pMP90 (pTiBo542ΔT-DNA) Gm^r	[197]
P. pastoris X-33	Wildtyp	Invitrogen

2.4.2 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit der Art *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH., var. Col-0 gearbeitet. Darüber hinaus wurde ein Teil der Untersuchungen unter Verwendung der Pflanzen *Nicotiana benthamiana* (L.) und *Nicotiana tabacum* (L.) durchgeführt. Die verwendeten transgenen Pflanzenlinien sind in der folgenden Übersicht dargestellt.

Bezeichnung	Beschreibung und Herkunft
*YUC8*ox (At027)	*A. thaliana* var. Col-0 mit T-DNA [*35S*::*YUC8*:*myc*, *bar*] aus Plasmid pD1-35S-YUC8-myc (027), [161]
*YUC8*tap (At066)	*A. thaliana* var. Col-0 mit T-DNA [$(35S)_2$::$(IgG\text{-}BD)_2$:PCS:$(His)_6$:$(myc)_9$:*YUC8*, *aacC1*] aus Plasmid pN-TAP-YUC8 (066), diese Arbeit (3.4)

*YUC8*ind (At041)	*A. thaliana* var. Col-0 mit T-DNA [XVE::*YUC8*:*myc*, *hpt*] aus Plasmid pER8G-YUC8-myc (041), [161]
*YUC8*gus (At093)	*A. thaliana* var. Col-0 mit T-DNA [YUC8-3kb::*uidA*, *bar*] aus Plasmid pD1-YUC8Prom3kb-GUS (093), diese Arbeit (3.9.1)
*YUC9*ox (At072)	*A. thaliana* var. Col-0 mit T-DNA [*35S*::*YUC9*:*myc*, *bar*] aus Plasmid pD1-35S-YUC9-myc (072), diese Arbeit (3.4)
*YUC9*tap (At067)	*A. thaliana* var. Col-0 mit T-DNA [$(35S)_2$::$(\text{IgG-BD})_2$:PCS:$(\text{His})_6$:$(myc)_9$:*YUC9*, *aacC1*] aus Plasmid pN-TAP-YUC9 (067), diese Arbeit (3.4)
*YUC9*ind (At076)	*A. thaliana* var. Col-0 mit T-DNA [XVE::*YUC9*:*myc*, *hpt*] aus Plasmid pER8G-YUC9-myc (076), diese Arbeit (3.4)
*YUC9*gus (At092)	*A. thaliana* var. Col-0 mit T-DNA [YUC9-3kb::*uidA*, *bar*] aus Plasmid pD1-YUC9Prom3kb-GUS (092), diese Arbeit (3.9.1)
yuc8 (At134)	*A. thaliana* var. Col-0, T-DNA-Nullmutante von *YUC8*, [389]
yuc9 (At135)	*A. thaliana* var. Col-0, T-DNA-Nullmutante von *YUC9*, [389]
yuc8/yuc9 (At112)	*A. thaliana* var. Col-0, T-DNA-Doppel-Nullmutante von *YUC8* und *YUC9*, Y. Zhao (Universität von Kalifornien, San Diego)
coi1 (At114)	*A. thaliana* var. Col-0 Nullmutante von *COI1*, [116]
aos/opr3 (At113)	Doppel-Nullmutante aus Kreuzung [40] von *A. thaliana* var. Col-6 (*aos*) [285] und *A. thaliana* var. Ws (*opr3*) [375]
*AOS*gus	*A. thaliana* var. C24 mit T-DNA [AOS-2kb::*uidA*, *NPT*II], [205]
*35S*gus (A18, At136)	*A. thaliana* var. Col-0 mit T-DNA [*35S*::*uidA*, *bar*], [31]

2.5 Behandlung und gentechnische Manipulation von biologischem Material

2.5.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte in 2YT-Flüssigkulturen im Inkubationsschüttler bei 30 – 37 °C und 220 upm oder auf LB-Festmedium im Brutschrank bei 37 °C [10]. *Agrobacterium tumefaciens* wurde in 2YT-Flüssigmedium im Inkubationsschüttler bei

160 upm bzw. auf LB-Festmedium im Brutschrank bei einer Temperatur von 28 – 30 °C angezogen. Die Zellen wurden bei Bedarf unter Selektionsdruck durch Zugabe entsprechender Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Gentamycin, 50 µg/ml Kanamycin, 50 µg/ml Rifampicin, 50 µg/ml Spectinomycin bzw. 25 µg/ml Zeocin) angezogen. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Flüssigkulturen 1 : 1 mit Lagermedium [65 % (v/v) Glycerin, 0,1 M $MgSO_4$, 25 mM Tris/HCl pH 8] versetzt und bei -20 °C bzw. -80 °C gelagert. Alle Medien wurden vor der Verwendung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Antibiotika wurden vor Gebrauch sterilfiltriert.

2.5.2 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E.-coli*-Zellen erfolgte mittels Hitzeschock/Calciumchlorid [154]. Nachdem die Zellen mit einem Teil eines Ligationsansatzes vermischt wurden, folgte der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C mit anschließender Abkühlung. Nach phänischer Expression für 45 min bei 37 °C wurde der Transformationsansatz auf LB-Festmedium ausgestrichen und unter Selektionsdruck über Nacht bei 37 °C inkubiert.
Mit Hilfe der Elektroporations-Methode [53] wurde Plasmid-DNA in elektrokompetente *A. tumefaciens* C58C1 bzw. GV3101 [197, 210] transformiert. Nach Zugabe des zu transformierenden Plasmids und Elektroporation der Zellen (2,5 kV, 25 mF, 200 Ω, 0,2 cm Elektrodenabstand) erfolgte die phänische Expression für 3 –4 h bei 28 – 30 °C. Nach Ausstreichen des Transformationsansatzes auf LB-Festmedium mit entsprechendem Selektionsdruck folgte eine Inkubation für zwei Tage bei 28 – 30 °C im Brutschrank (2.5.1).

2.5.3 Anzucht von *Escherichia coli* zur heterologen Proteinexpression

Die Expression C-terminal doppeltmarkierter myc-$(His)_6$-Fusionsproteine erfolgte durch das Plasmid pTrcHis2A in *E. coli* TOP10 in Anlehnung an die Herstellerangaben (Invitrogen). Das myc-Epitop [106] diente der Immundetektion (2.8.4). Der Hexahistidin-Anhang wurde zur affinitätschromatographischen Aufreinigung (2.7.5) genutzt. Aus 4 ml 2YT-Übernachtkulturen wurde frisches 2YT-Medium beimpft und unter Selektionsdruck (2.5.1) unter verschiedenen Versuchsbedingungen bei 4 – 37 °C und 220 upm inkubiert. Die Expression wurde in Abhängigkeit vom jeweiligen Experiment nach Erreichen einer OD_{600} von 0,6 – 1,6 durch Zugabe von 0,1 – 1 mM IPTG induziert und die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zentrifugation geerntet (1 min, 15 000 × g). Die Sedimente wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung (2.7.1) gelagert.

N-terminale MBP-Fusionsproteine wurden unter ähnlichen Bedingungen nach Herstellerangaben (New England Biolabs), jedoch unter Verwendung von *E. coli* K12 TB1 exprimiert. Mittels der Plasmid-Konstrukte pMAL-c2x bzw. pMAL-p2x sollte eine Sekretion in das Medium bzw. eine Expression in der Zelle erfolgen. Daher wurden entsprechend der Überstand und das Sediment bis zu weiteren Verarbeitung (2.7.1) bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.4 Anzucht und Lagerung von *Pichia pastoris*

Zur Anzucht der Hefe *P. pastoris* wurden 15 ml YPD-Flüssigmedium [1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 2 % (w/v) Glukose] mit den entsprechenden Gefrierkulturen beimpft und in einem 300 ml Schikanekolben bei 29 °C und 250 upm über Nacht inkubiert. Die Anzucht auf YPD-Festmedium [YPD, 2 % (w/v) Agar] erfolgte für zwei bis drei Tage bei 29 °C. Vor der Verwendung wurden die benötigten Medien für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Als Selektionsdruck diente 100 µg/ml Zeocin. Die Lagerung von *P. pastoris* erfolgte in YPD-Medium mit 15 % (v/v) Glycerin bei -80 °C.

2.5.5 Transformation von Plasmid-DNA in *P. pastoris*

Für eine Transformation von *P. pastoris* wurden frische kompetente Zellen in Anlehnung an CALVIN und HANAWALT hergestellt [53]. Hierfür wurde eine 50 ml Kultur mit *P. pastoris* X-33-Zellen bei 29 °C und 280 upm bis zu einer OD_{600} von 1,3 – 1,5 angezogen und anschließend bei 4 °C sedimentiert (5 min, 1500×g). Nach Aufnahme in 200 ml eiskaltem, sterilem H_2O folgten drei aufkonzentrierende Waschschritte in eiskalten Lösungen (100 ml H_2O; 10 ml 1 M Sorbitol; 1 ml 1 M Sorbitol). 80 µl der kompetenten Zellen wurden mit 10 µg *Sac*I linearisierter Plasmid-DNA (2.6.1) für 5 min auf Eis inkubiert und darauf in Elektroporationsküvetten überführt. Nach Elektroporation (2,5 kV, 25 mF, 200 Ω, 0,2 cm Elektrodenabstand) wurden die transformierten Zellen mit 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, für 1 – 2 h bei 29 °C inkubiert und anschließend auf Selektionsmedium ausplattiert (2.5.4).
Um Doppelrekombinationsereignisse auszuschließen, wurden die positiven Transformanden anschließend sowohl auf Methanol-haltiges [1,5 % (w/v) Agar, 1,34 % (w/v) YNB, 4×10^{-5} % (w/v) Biotin, 0,5 % (v/v) Methanol] als auch auf Glycerin-haltiges Festmedium [1,5 % (w/v) Agar, 1,34 % (w/v) YNB, 4×10^{-5} % (w/v) Biotin, 1 % (v/v) Glycerin] überführt und angezogen. Transformanden, welche auch auf Methanol-haltigem Medium gewachsen sind, enthielten noch die intakte Methanol-induzierbare Promotor-Sequenz und wurden für spätere Expressionsstudien verwendet (2.5.6).

2.5.6 Anzucht von *P. pastoris* zur heterologen Proteinexpression

Für die Expression rekombinanter Proteine in *P. pastoris* wurden Transformanden (2.5.5) in BMGH [100 mM KP_i pH 6, 1,34 % (w/v) YNB, 4×10^{-5} % (w/v) Biotin, 1 % (v/v) Glycerin] bis zu einer OD_{600} von 2 – 6 bei 29 °C angezogen. Nach Sedimentation der Hefekulturen bei RT (5 min, 1500×g) wurden diese bis zu einer OD_{600} von 1 in BMMH [100 mM KP_i pH 6, 1,34 % (w/v) YNB, 4×10^{-5} % (w/v) Biotin, 0,5 % (v/v) Methanol] verdünnt, um die Expression zu induzieren. Die Anzucht erfolgte über vier bis fünf Tage bei 29 °C und 250 upm. Die Induktorkonzentration zur Expression des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 0,5 % (v/v) Methanol alle 24 h aufrechterhalten. Zur Analyse sezernierter oder intrazellulär exprimierter Proteine mittels SDS-PAGE (2.8.2) wurden während der Versuchsreihe zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquote der Kultur entnommen, die Zellen sedimentiert und sowohl das Sediment als auch der Überstand zur späteren Aufarbeitung (2.7.2) bei -20 °C gelagert.

2.5.7 Anzucht von *Arabidopsis-thaliana*-Wurzelzellkulturen zur homologen Proteinexpression

Die Transformation und Anzucht von *A.-thaliana*-Wurzelzellkulturen wurde freundlicherweise von H. Frerigmann (Universität zu Köln) in Anlehnung an BERGER *et al.* durchgeführt [26]. Die Plasmide (pN-TAP-YUC8, pN-TAP-YUC9 bzw. pD1-35S-YUC8-myc, pD1-35S-YUC9-myc) wurden zunächst in hypervirulente *A.-tumefaciens*-Stämme (LBA4404.pBBR1MCS-*5virGN54D* bzw. LBA4404.pBBR1MCS-*virGN54D*) eingebracht. Anschließend erfolgte die stabile Transformation mittels der Plasmid-tragenden Bakterien und die Co-Transformation von p19-Protein-tragenden *A.-tumefaciens*-Zellen, zur Unterdrückung von „gene-silencing"-Mechanismen (PTGS) [422], in *A.-thaliana*-Wurzelzellkulturen. Die transfizierten Wurzelzellkulturen wurden für 4 – 5 Tage angezogen, anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die weitere Aufarbeitung (2.7.3) bei -80 °C gelagert.

2.5.8 Anzucht von Pflanzen

Die Anzucht von *A. thaliana* erfolgte unter sterilen Bedingungen. Hierzu wurde das Saatgut mit 70 % (v/v) Ethanol benetzbar gemacht (1 min), anschließend mit 5 % (v/v) Natriumhypochlorid sterilisiert (5 min) und mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen. Die Aussaat erfolgte auf sterilem Pflanzenwuchsmedium [½MS mit MS-Vitamin-Mix [260], 1 % (w/v) Saccharose, 0,8 % (w/v) Phyto-Agar] in mit Parafilm verschlossenen

Petrischalen. Nach Stratifizierung für 48 h bei 4 °C erfolgte die weitere Anzucht unter kontrollierten Kurztagbedingungen (8 h Lichtphase mit 150 µE·m^{-2}·s^{-1} bei 24 °C, 16 h Dunkelheit bei 20 °C, 70 % relative Luftfeuchtigkeit) in Phytokammern. Für experimentelle Studien unter kontrollierten Bedingungen wurden die Keimlinge im Alter von zwei Wochen in Weckgläser mit autoklavierter Erde umgesetzt und weiter unter Kurztagbedingungen in Phytokammern kultiviert.
Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten transgenen Pflanzen (2.4.2) wurden unter den gleichen Bedingungen, jedoch unter Selektionsdruck mit entsprechenden Antibiotika (20 µg/ml Gentamycin für *YUC8*tap und *YUC9*tap sowie 15 µg/ml Hygromycin für *YUC8*ind und *YUC9*ind) angezogen. Nach vier bis fünf Wochen wurden die Linien auf eine Mischung aus Bimskies, Kompost, Sand und Torf (im Folgenden Standarderde genannt) umgesetzt und im Gewächshaus (tagsüber 20 – 25 °C, nachts 18 – 20 °C, 70 % relative Luftfeuchtigkeit, durchschnittliche Lichtintensität 70 µE·m^{-2}·s^{-1}) unter Langtagbedingungen (16 h Licht pro Tag) weiter zur phänotypischen Analyse und Samengewinnung angezogen. BASTA®-resistente Pflanzen (*YUC8*ox, *YUC9*ox, *YUC8*gus, *YUC9*gus) wurden direkt auf Standarderde ausgesät und nach Ausbreiten der Primärblätter mit 50 µg/ml BASTA® unter Verwendung einer Sprühflasche selektioniert
Andere Mutanten wurden entsprechend ihrer Referenzen angezogen (2.4.2). Da die homozygote *coi1*-Linie männlich steril ist, erfolgte die Samengewinnung ausschließlich über heterozygote Pflanzen. Die experimentellen Arbeiten wurden jedoch mit homozygoten Pflanzen durchgeführt. Hierfür wurden Mutanten der *coi1*-Linie im Vorfeld auf Pflanzenwuchsmedium mit 30 µM MeJA anhand ihrer erhöhten MeJA-Toleranz selektioniert. Die Blüten der *aos/opr3*-Mutante wurden mit einer MeJA-Lösung [100 µM MeJA, 0,1 % (v/v) Tween 20] behandelt, um ihrer männlichen Sterilität entgegenzuwirken und dadurch ausreichend Saatgut zu erhalten.
Bei den zur transienten Expression benötigten Tabakpflanzen (2.5.9, 2.5.12) erfolgte die Anzucht unter nichtsterilen Bedingungen auf Standarderde im Gewächshaus. *Nicotiana benthamiana* und *Nicotiana tabacum* wuchsen nach Aussaat bei 12 h Licht pro Tag und wurden nach drei Wochen in Standarderde umgetopft, um eine normale Entwicklung des Wurzelsystems zu ermöglichen.

2.5.9 Transiente Transformation von DNA in *Nicotiana benthamiana*

Für eine transiente Expression in Blättern von *N. benthamiana* wurde 30 ml 2YT-Medium 1 : 200 mit einer *A.-tumefaciens*-Vorkultur beimpft und unter Selektionsdruck für zwei Tage bei 28 – 30 °C und 160 upm inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 1,5 – 3 wurden

die Bakterien sedimentiert (10 min, 5000×g) und 1 : 10 in Infiltrationslösung-T [10 mM $MgCl_2$, 150 µM Acetosyringon, 10 mM MES, pH 5,6] aufgenommen. Für eine Doppeltransformation zwecks Co-Expression des p19-Proteins [422] wurden das Konstrukt und pBin61-p19 (2.3.2) in Anlehnung an WALTER *et al.* [424] im Verhältnis 0,7 : 1 gemischt und auf 20 ml Infiltrationslösung-T aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 3 – 4 h bei RT erfolgte die Infiltration von Tabakblättern. Hierzu wurden 4 – 5 Wochen alte *N.-benthamiana*-Blätter gleicher Größe von der Unterseite mit der *A.-tumefaciens*-Suspension infiltriert. Je nach Studie erfolgte die Aufarbeitung von 30 – 300 mg Blattmaterial zu den angegebenen Zeitpunkten (2.5.10, 2.6.6, 2.7.3). Die phänotypischen Ausprägungen wurden digital dokumentiert (2.13).

2.5.10 Aufbereitung von Pflanzenmaterial zur mikroskopischen Analyse von Zellepidermis-Schichten

Zur Untersuchung von Tabak-Epidermiszellen wurden Blätter einer infiltrierten Tabakpflanze (2.5.9) mit einem Mixer (Waring Blender, 40 ml Aufsatz) aufbereitet. Hierfür wurden Blattstücke in 20 ml NaP_i-Puffer (pH 7,5) zerkleinert. Abgetrennte Epidermisfragmente, welche auf der Blattsuspension schwammen, wurden mit einer Pinzette abgenommen und zur mikroskopischen Analyse vorbereitet (2.13). Alternativ wurde von älteren Tabak-Blattgeweben und *A.-thaliana*-Blättern die Epidermisschicht mit einer Pinzette abgelöst und untersucht.

2.5.11 Stabile Transformation von DNA in *A. thaliana*

Für eine stabile Transformation von DNA in das Genom von *A. thaliana* wurde 600 ml 2YT mit den gewünschten *A. tumefaciens* Zellen angeimpft und unter entsprechendem Selektionsdruck für ein bis zwei Tage bei 28 – 30 °C und 160 upm inkubiert. Anschließend wurden die sedimentierten Bakterien (10 min, 5000×g) mit Infiltrationslösung-A [5 % (w/v) Saccharose, 0,01 % (v/v) Silwet L-77] auf eine OD_{600} von 0,8 eingestellt. Die Transformation sieben Wochen alter *A.-thaliana*-Pflanzen erfolgte mittels der „floral-dip"-Methode nach CLOUGH und BENT [73]. Nach Abblühen der Pflanzen wurden die Samen geerntet, ausgesät und unter Selektionsdruck angezogen (2.5.8).

2.5.12 Biolistische Transformation von Pflanzen

Die transiente Transformation von GFP-Fusionskonstrukten in Pflanzen erfolgte mit Hilfe einer „Particle Inflow Gun" [50, 117]. 25 mg Goldpartikel wurden mit Ethanol und destilliertem Wasser gewaschen, in 500 µl 50 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in

50 µl-Aliquots aufgeteilt. Unter ständigem Mischen erfolgte die Zugabe von 50 µl 2,5 M $CaCl_2$ und 15 µl 1 M Spermidin zu 5 µg der zu transformierenden hochreinen Plasmid-DNA (2.6.3). Nach anschließendem Waschen mit Ethanol wurden die Mikroprojektile in 50 µl Ethanol resuspendiert. Es wurden 2 – 4 Wochen alte *A.-thaliana*-Pflanzen und ausgestanzte *N.-tabacum*-Blattstückchen mit p35S-YUC8-GFP, p35S-GFP-YUC8, p35S-YUC9-GFP bzw. p35S-GFP-YUC9 (2.3.2) transformiert. Die Blattstückchen wurden nach dem Beschuss auf Filterpapier mit MS-Lösung gelegt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Der Beschuss erfolgte mit 6,5 bar, 7 cm Abstand zum Streugitter, 12 cm Abstand zum Pflanzengewebe und bei einem Kammervakuum von -0,8 bar. Um eine hohe räumliche Abdeckung zu gewährleisten, wurden drei dezentrale Schüsse abgegeben. Nach der Transformation inkubierten die Pflanzen für 24 – 48 h unter Langtagbedingungen (2.5.8) in der Phytokammer, um eine Expression der Fusionsproteine zu erlauben. Die anschließende Analyse erfolgte an entsprechenden Fluoreszenzmikroskopen (2.13).

2.5.13 Induktionsbedingungen zur Transkriptanalyse von *A. thaliana*

Für die Transkriptanalysen wurden steril angezogene sieben Tage alte Keimlinge verwendet (2.5.8), die definierten Umwelt- und Stressbedingungen ausgesetzt waren. Bei transgenen Pflanzen handelte es sich um vorher selektionierte, homozygote Linien. Damit Vergleiche mit Wildtyppflanzen und anderen Mutanten durchgeführt werden konnten, wurden sie ohne Selektionsdruck angezogen. Um Verfälschungen des Transkriptionsprofils durch wechselnde Licht- oder Temperaturintensitäten zu vermeiden, erfolgte die Versuchsdurchführung an derselben Position innerhalb der Phytokammer zur gleichen Uhrzeit. Zur Induktion wurden die Keimlinge in ½MS-Lösungen mit den Substanzen inkubiert und als Kontrolle jeweils ½MS-Lösung mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel der eingesetzten Induktoren verwendet. Als Wund- und Stressfaktoren dienten 50 µM OPDA, 50 µM MeJA bzw. 10 µM Coronatin. Zur Vermeidung einer zu schnellen Verflüchtigung der Substanzen wurden die Petrischalen nach Induktion abgedeckt.
Als weitere Veränderungen biotischer und abiotischer Faktoren kamen folgende Bedingungen zum Einsatz: Licht (Neutralschatten, Dunkelheit, dunkelrotes Licht), Entwicklungsbedingungen (etioliert, etioliert + 2 h Licht), Temperatur (4 °C, 38 °C), osmotische Veränderungen bzw. Membranstress (150 mM NaCl, 400 mM Mannitol, 6 % (w/v) Glucose) sowie 0,5 mM Trp, 0,25 mM 5-MT, 10 µM ACC, 1 mM Ethephon und 100 µM Abscisinsäure. Die Dauer der Behandlung wurde, wenn nicht anders angegeben, für zwei Stunden durchgeführt. Verwundungsexperimente von Blättern wurden mit Hilfe

einer Arterienklemme [212] und Verwundungsstudien von Keimlingen mit einer sterilisierten Pinzette durchgeführt, indem ein Blatt bzw. Kotyledone zur Hälfte verletzt wurde. Experimente bei verschiedenen Lichtbedingungen sowie die Analyse unterschiedlicher Temperatureinflüsse erfolgten in entsprechend eingestellten Lichtkammern. Um Schwankungen zu minimieren und genügend Probenmaterial zu erhalten, wurden bei jeder Probennahme mittels einer Federstahlpinzette 45 – 50 Keimlinge (entspricht 50 – 60 mg) aus einer Petrischale geerntet und bis zur Isolierung der RNA (2.6.6) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.5.14 Analysen zum Wurzelwachstum von *Arabidopsis*-Mutanten

Um die Rolle von Überexpression und Verlust der Genfunktion näher zu untersuchen, wurde Pflanzennährmedium mit verschiedenen, sterilfiltrierten Substanzen supplementiert. Die Samen der zu untersuchenden Linien wurden im oberen Bereich der Petrischale ausgesät und nach Stratifikation senkrecht unter Kurztagbedingungen in die Phytokammer gestellt, so dass die Wurzel auf dem Medium gravitrop nach unten wachsen konnte (2.5.8). Nach etwa zwei bis drei Wochen erfolgte die Analyse des Wurzelwuchsverhaltens, insbesondere der Wurzellänge, Anzahl der Seitenwurzeln und der Wurzelbehaarung. Hierfür wurden die Pflanzen auf den Petrischalen fotografiert und mit der Software ImageJ ausgewertet (2.13). Die Ergebnisse wurden mit parallel durchgeführten Kontrollen, welche auf unsupplementiertem Medium wuchsen und im Vergleich zu Wildtyppflanzen normiert. Bei den induzierbaren Überexpressionslinien *YUC8*ind und *YUC9*ind (2.4.2) wurde dem Pflanzenwuchsmedium zusätzlich 10 µM β-Estradiol hinzugefügt [460], um die Expression zu induzieren.

2.6 Molekularbiologische Methoden und Verfahren

2.6.1 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

Die verwendeten Methoden entsprachen Standardprotokollen [10, 331]. DNA-Restriktionen erfolgten mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II in mitgelieferten Puffern nach Herstellerangaben. Entstandene DNA-Fragmente wurden über horizontale Gelelektrophorese in Agarosematrix (2.6.12) getrennt und unter Verwendung des Gelelutionssets NucleoSpin® Extract II Kit nach Herstellerangaben (Macherey & Nagel) eluiert. Zur Klonierung von DNA-Fragmenten mit inkompatiblen Enden wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I verwendet, um durch Auffüllen von 5'-überhängenden Restriktionsenden stumpfe Enden zu erzeugen. Die Ligation gereinigter

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben (Promega).

2.6.2 Homologe *In-vitro*-Rekombination von DNA

Eine Alternative zur herkömmlichen Klonierung bietet die Gateway™-Technologie [157, 423]. Die Technik beruht auf der ortsspezifischen Rekombinationsreaktion des Bakteriophagen λ, welche während des lysogenen Zyklus die Integration in das Genom von *E. coli* ermöglicht. Für diese Rekombination sind sogenannte „attachment sites“ (att) erforderlich. Werden diese kurzen att-DNA-Sequenzen mittels PCR-Amplifikation oder Klonierung in einen Eingangsvektor an ein DNA-Fragment gebracht, so kann über diesen Vektor die enzymatisch katalysierte Rekombination des DNA-Fragments in jeden kompatiblen Zielvektor erfolgen. Zielvektoren besitzen hierfür äquivalente att-Sequenzen, welche als Erkennungssequenz für den Austausch dienen. In dieser Arbeit wurden ortsspezifische BP- bzw. LR-Rekombinationen nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Für die Anzucht der Bakterien mit den Zielvektoren pER8-GAT, pNTAPa und pSP-DEST1.1 sowie der Eingangsvektoren pENTR1A, pDONR221, pMH018-ENTR1-35S und pSP-ENTR2 (2.3.2) wurde aufgrund des *ccdB*-Gens der Stamm *E. coli* DB3.1 verwendet (2.4.1). Das *ccdB*-Genprodukt führt zum Absterben nichtresistenter Bakterien. *E. coli* DB3.1 besitzt ein *gyr*A462-Allel, welches eine Resistenz vermittelt [28]. Nach ortsspezifischer Rekombination erfolgte eine Transformation in nichtresistente *E.-coli*-Zellen. Positiven Vektoren fehlt durch die Rekombination von fertigen Eingangs- mit den Zielvektoren das *ccdB*. Im Gegensatz zu nichtrekombinierten Vektoren, welche durch eine Expression von *ccdB* in den anderen *E.-coli*-Zellen nicht lebensfähig sind, können sie wachsen und ermöglichen so eine eindeutige Selektion. Hinzu kommt ein Resistenzwechsel vom Eingangsvektor zum rekombinierten Zielvektor, z.B. Amp^r nach Kan^r oder Kan^r nach Amp^r.

2.6.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse aus 1,5 ml einer Übernachtkultur (2.5.1) [33]. Für eine Plasmid-Schnellisolation wurden die Zellen nach Sedimentation (1 min, 16 000×g) in 50 µl BB-Puffer [10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 15 % (v/v) Saccharose, 2 mg/ml Lysozym, 0,2 mg/ml RNase, 0,1 mg/ml BSA] für 3 min bei RT inkubiert und anschließend aufgekocht (1 min, 95 °C). Nach Abkühlen auf Eis wurden die Zelltrümmer sedimentiert (10 min, 16 000×g). 5 µl des Überstandes wurden nun für eine Restriktion (2.6.1) oder zur PCR (2.6.9) eingesetzt

oder bei -20 °C gelagert. Die Extraktion von Plasmiden aus *A. tumefaciens* erfolgte ebenfalls mittels alkalischer Lyse, jedoch mit einem vorherigen Waschschritt [0,1 % (w/v) *N*-Laurylsarkosyl, 20 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7,5] aus 3 ml einer Übernachtkultur. Hochaufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits nach Herstellerangaben (Qiagen) gewonnen. Die anschließende Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.6.4 DNA-Isolierung aus *P. pastoris*

1,5 ml einer *P.-pastoris*-Übernachtkultur (2.5.4) wurden sedimentiert (1 min, 12 000×g) und in STET-Puffer [50 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM EDTA, 5 % (v/v) Triton X-100, 7,5 M Ammoniumacetat] resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Hefezellen mit 250 µl Glasperlen durch starkes Mischen für 5 min. Nach Zugabe von 250 µl STET wurden die Proben für 3 min bei 95 °C aufgekocht und auf Eis abgekühlt. Nach Sedimentation der Zelltrümmer (10 min, 3 000×g) wurden 0,5 ml des Überstandes mit 1 ml eiskaltem Ethanol versetzt, für 30 min auf Eis inkubiert und die Proben zentrifugiert (15 min, 12 000×g). Zum Entsalzen folgten zwei Waschschritte mit 70 % (v/v) Ethanol. Anschließend wurde die sedimentierte DNA getrocknet, in 50 µl H_2O resuspendiert und daraufhin mittels PCR (2.6.9) analysiert.

2.6.5 Aufarbeitung von DNA aus Pflanzen

Die Aufreinigung pflanzlicher DNA erfolgte in Anlehnung an MURRAY und THOMPSON [262]. Etwa 50 mg Pflanzenmaterial (2.5.8) wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bis zum Auftauen der Pflanzenteile zerkleinert. Anschließend wurde 0,3 ml CTAB-Puffer [2 % (w/v) CTAB, 100 mM Tris/HCl pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl] zugegeben, welcher als Komplexbildner für Nukleinsäuren dient. Nach ausreichender Homogenisierung und anschließender Inkubation für 30 Minuten bei 65 °C wurde der Extrakt mit 0,3 ml Chloroform vermischt und zur schnelleren Phasentrennung zentrifugiert (5 min, 16 000×g). Die Oberphase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 300 µl Isopropanol und 10 µl 3 M Natriumacetat versetzt. Durch Zentrifugation (5 min, 16 000×g) konnten die präzipitierten Nukleinsäuren sedimentiert werden, um diese anschließend mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol zu waschen. Nach etwa einstündiger Trocknung bei RT wurde das Sediment in 40 µl H_2O mit 0,1 mg/ml RNase aufgenommen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Mit der gewonnenen Gesamt-DNA konnten anschließend PCR-Analysen durchgeführt werden (2.6.9).

2.6.6 Isolierung pflanzlicher Gesamt-RNA

Die Reinigung pflanzlicher RNA erfolgte unter Verwendung des Trizol®-Reagenz laut Herstellerangaben. Hierzu wurden jeweils 50 – 100 mg Gewebe (2.5.8) geerntet, gesäubert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial durch Mörsern zerkleinert, mit 1 ml Trizol® versetzt und weiter homogenisiert. Um RNA-Komplexe zu lösen, wurde der Extrakt für 3 min bei 25 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform, intensivem Mischen und Inkubation für 3 min bei 25 °C wurde zur schnelleren Phasentrennung zentrifugiert (15 min, 12 000 × g). Die Oberphase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 0,5 ml Isopropanol und 500 ml Salzlösung [0,8 M NaAc, 1,2 M NaCl] versetzt. Nach Inkubation (10 min, 25 °C) wurde durch Zentrifugation (10 min, 12 000 × g) ein RNA-haltiges Sediment gewonnen. Nach Waschen des Sediments mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol erfolgte eine kurze Trocknung bei 50 °C. Daraufhin wurde die RNA in 100 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert, optional einer Behandlung mit DNase I nach Herstellerangaben (Fermentas) unterzogen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 260 nm. Die Reinheit konnte durch das Verhältnis von 260 zu 280 nm ermittelt werden, welches mindestens 1,8 betrug. Mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese (2.6.12) wurde die Unversehrtheit der RNA kontrolliert. Je nach Versuchsreihe folgte im Anschluss eine Poly(A)$^+$-mRNA-Aufreinigung (2.6.7) oder die direkte Synthese von cDNA (2.6.8).

2.6.7 Gewinnung von prozessierter mRNA aus Gesamt-RNA

Für Transkriptmengenanalysen mittels qPCR (2.6.11) wurde die Poly(A)$^+$-mRNA aus den RNA-Ansätzen (2.6.6) weiter aufgereinigt. Diese Vorgehensweise erlaubte eine höhere Anreicherung und Reinheit der mRNA, da die Anwesenheit anderer zellulärer Komponenten (z.B. rRNA, unreife prä-mRNA) weitgehend ausgeschlossen werden kann. Die mRNA-Präparation erfolgte mit Oligo-dT-beschichteten Latex-Partikeln (Oligotex), welche unter Hochsalz-Bedingungen spezifisch an die Poly(A)$^+$-Bereiche der prozessierten mRNA [444] hybridisieren. Hierfür wurde das Oligotex Direct mRNA Kit einschließlich entsprechender Puffer nach Herstellerangaben (Qiagen) und folgendem Protokoll verwendet. Es wurden 80 µl Gesamt-RNA mit 170 µl H_2O, 250 µl OBB-Puffer und 15 µl Oligotex gemischt und nach Inkubation (3 min bei 70 °C, 10 min bei 25 °C) zentrifugiert (2 min, 16 000 × g). Anschließend folgten zwei Waschschritte mit OW2-Puffer. Daraufhin wurde das resuspendierte Oligotex-Sediment in die mitgelieferten Säulen überführt und durch zweimalige Zentrifugation (1 min, 16 000 × g) getrocknet. Die an

die Oligotex-Matrix hybridisierte Poly(A)$^+$-mRNA wurde durch 60 µl 70 °C heißen OEB-Puffer und Zentrifugation (1 min, 16 000 × g) in ein neues Eppendorf-Gefäß eluiert. Direkt im Anschluss erfolgte die cDNA-Synthese (2.6.8).

2.6.8 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription

Ausgehend von der Gesamt-RNA (2.6.6) bzw. Poly(A)$^+$-mRNA, (2.6.7) erfolgte die cDNA-Synthese mittels reverser Transkription. Hierzu wurde 3 µg Gesamt-RNA (bei Poly(A)$^+$-mRNA die entsprechende Menge: Anteil der mRNA von Gesamt-RNA etwa 2 %) aus *A.-thaliana*-Pflanzen in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion erfolgte mit Hilfe der M-MLV-Reverse-Transkriptase (Promega) unter Verwendung entsprechender Puffer und RNasin. Die dNTPs (Finnzymes) und die Oligo-d(T)$_{18}$-Starteroligonukleotide (Promega) wurden nach Herstellerangaben für einen 25 µl-Ansatz verwendet und anschließend 1 : 10 verdünnt. Aliquots der gewonnenen DNA-RNA-Hybride wurden daraufhin zur semiquantitativen (2.6.10) bzw. quantitativen (2.6.11) PCR eingesetzt.

2.6.9 Polymerase-Kettenreaktion

Zur selektiven Amplifizierung von DNA-Abschnitten [259] wurden, abhängig von den Experimenten, die iProof™ HF DNA Polymerase, das *Taq*-Polymerase-Kit DyNAzyme, das HotStarTaq Master Mix Kit oder die *Pfu* DNA Polymerase mit entsprechenden Puffern und dNTPs in 10 – 50 µl-Ansätzen nach Herstellerangaben (2.2.1) eingesetzt. Die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide (2.3.1) wurde nach BRESLAUER *et al.* berechnet [46]. Die verwendeten Reaktionsbedingungen sind bei den entsprechenden Experimenten aufgeführt. Dabei sind die PCR-Angaben in folgender Reihenfolge zu lesen: initiale Denaturierungszeit, initiale Denaturierungstemperatur; [Denaturierungszeit, Denaturierungstemperatur; Anlagerungszeit, Anlagerungstemperatur; Elongationszeit, Elongationstemperatur] × Anzahl der Zyklen; Elongationszeit, Elongationstemperatur. Die Amplifikate wurden anschließend per Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (2.6.12) oder direkt über das NucleoSpin® Extract II Kit nach Herstellerangaben (Macherey & Nagel) aufgereinigt.

2.6.10 PCR zur semiquantitativen Transkriptmengenanalyse

Die mittels reverser Transkription gewonnenen DNA-RNA-Hybride wurden in einer PCR (2.6.9) mit spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in 2.3.1 unter Expressionsanalyse im Namen mit „RT“ gekennzeichnet. Als Referenzgene dienten je nach Versuchsreihe *ACT2*, *APT1*, *PDF2* und *UBQ10* [82]. Die

Oligonukleotidpaare wurden so gewählt, dass Amplifikate zwischen 600 und 800 bp entstanden. Für die semiquantitative PCR wurde das HotStarTaq Master Mix Kit mit folgendem PCR-Programm genutzt: 15 min, 95 °C; [30 s, 94 °C; 30 s, 60 °C; 15 s, 72 °C] × 35; 10 min, 72 °C. Nach anschließender gelektrophoretischer Auftrennung (2.6.12) konnten anhand der Referenzgene mögliche Transkriptmengenänderungen nachvollzogen werden.

2.6.11 Quantitative Transkriptmengenanalyse mittels „Real-Time"-PCR

Für eine quantitative Bestimmung der Transkriptmengen wurden ausgehend von cDNA-Poly(A)$^+$-mRNA-Hybriden (2.6.8) „Real-Time"-PCR-Studien (qPCR) mittels des QuantiFast™SYBR® Green PCR Kits nach Herstellerangaben (Qiagen) am „Real-Time"-PCR-Thermoblock „DNA Engine Opticon® 2" durchgeführt. Die spezifischen Oligonukleotidpaare sind in 2.3.1 im Namen mit „qPCR" gekennzeichnet und so gewählt, dass Amplifikate von etwa 170 – 190 bp entstanden. Als Referenzgene dienten *EF-1α*, *APT1* und *UBQ10* [82]. Die Probenanalyse erfolgte jeweils in Tripletts zu je 25 µl. Es wurde eine 2-Schritt-PCR mit kombiniertem Anlagerungs- und Elongationsschritt unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 5 min, 95 °C; [10 s, 95 °C; 30 s, 60 °C] × 40. Die Auswertung der C_T-Werte wurde mit Hilfe der Software Opticon® 2 Monitor (Version 2.02.24, MJ Research) durchgeführt. Unter Berücksichtigung der Oligonukleotidpaar-Amplifikationseffizienzen [306, 397] erfolgte die statistische Auswertung mit Hilfe der komparativen C_T-Methode [226, 342] und den Programmen geNorm (Version 3.5) und REST 2005 (Version 1.9.12) [292, 414]. Die Signifikanz der ermittelten Werte vor und nach Induktion (2.5.13) bzw. zur entsprechenden Kontrolle wurde mit Hilfe des Zweistichproben-*t*-Tests ermittelt (2.14).

2.6.12 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

Für eine horizontale Gelektrophorese wurden DNA-Proben mit 1/3 Volumen DNA-Gel-Ladepuffer [50 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol] versetzt und auf 0,6 – 1,8 % (w/v) Agarosegele unter Verwendung von TAE-Puffer [40 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid] aufgetragen. RNA-Proben wurden mit dem 1 – 3-fachen Volumen RNA-Gel-Ladepuffer [25 mM MOPS/NaOH pH 7,0, 62,5 % (v/v) deionisiertes Formamid, 1,14 M Formaldehyd, 1,25 mM EDTA, 6,25 mM NaAc, 50 µg/µl Ethidiumbromid] versetzt, für 10 min bei 70 °C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt, um Sekundärstrukturen zu denaturieren.

Anschließend wurden die Proben auf 1,25 % (w/v) Agarosegele [20 mM MOPS/NaOH pH 8,0, 1,25 mM EDTA, 6,25 mM NaAc, 6 % (v/v) Formaldehyd] mit entsprechendem Laufpuffer [20 mM MOPS/NaOH pH 7,0, 3,7 % (v/v) Formaldehyd] aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA. Bei DNA-Gelen ermöglichte der Standard „1 kb DNA Ladder“ eine Größenabschätzung. Da bei RNA-Gelen lediglich die Qualität der RNA anhand der rRNA-Banden analysiert wurde, benötigten diese keinen Standard.

2.6.13 Quantifizierung spezifischer DNA-Sequenzen mittels radioaktiver und nichtradioaktiver Verfahren

Zur Analyse der Insertionshäufigkeit von T-DNA-Insertionsmutanten wurde die Gesamt-DNA aus 50 – 100 mg Blattmaterial extrahiert (2.6.5). Für den nachfolgenden enzymatischen Verdau mit *Eco*RI bzw. *Hind*III wurden 10 µg der gewonnenen DNA mit jeweils 2 µl des Restriktionsenzyms versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert (2.6.1). Die Fragmente sowie 0,1 – 1 ng eines Kontrollplasmids wurden über ein 0,8 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt (2.6.12). Nach ausreichender elektrophoretischer Auftrennung erfolgte die fotografische Dokumentation mittels UV-Licht und einem Lineal, um eine spätere Größenabschätzung der detektierten Signale zu gewährleisten. Anschließend folgte die Vorbehandlung des Agarosegels bei RT: 10 min Ansäuerung [250 mM HCl], 3 min Waschung [H_2O], 2 × 15 min Denaturierung [0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl], 3 min Waschung [H_2O], 2 × 15 min Neutralisierung [0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl], 10 min Äquilibrierung in 20 × SSC [0,3 M Natriumcitrat pH 7, 3 M NaCl]. Der Kapillartransfer fand in Anlehnung an SOUTHERN statt („Southern-Transfer“) [361]. Die DNA-Fragmente im vorbehandelten Agarosegel wurden im Kapillartransferverfahren unter Verwendung von 20 × SSC als Transferpuffer auf eine positive Nylonmembran über Nacht transferiert. Die Fixierung der DNA erfolgte durch 2 min UV-Licht bei 0,120 J/cm^3.
Unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (2.3.1) wurde eine Sonde gegen das BASTA®-Resistenz-vermittelnde Gen *bar* (286 bp, 68 % GC-Gehalt, 53 °C Hybridisierungstemperatur), eine Sonde gegen das Kanamycin-Resistenz-vermittelnde Gen *NPT*II (899 bp, 59 % GC-Gehalt, 51 °C Hybridisierungstemperatur) und eine Sonde gegen den T-DNA-Bereich, aus dem für die Herstellung von Nullmutanten verwendeten Vektor pROK2 (751 bp, 44 % GC-Gehalt, 44 °C Hybridisierungstemperatur), erstellt. Die Synthese nichtradioaktiver Sonden erfolgte unter Verwendung des PCR DIG Probe Synthesis Kits nach Herstellerangaben (Roche), wobei bei der Synthese der

Sonde mittels PCR (2.6.9) an Digoxigenin gekoppeltes dUTP eingebaut wurde. Die Hybridisierung erfolgte mit Hilfe von DIG Easy Hyb Granules nach Herstellerangaben (Roche) mit der Sonden-spezifischen Hybridisierungstemperatur. Ebenso erfolgte die Chemilumineszenz-Reaktion mittels des DIG Luminescent Detection Kits nach Herstellerangaben (Roche). Die Detektion der CSPD-vermittelten Chemilumineszenz wurde mit Hilfe von Röntgenfilmen, wie in Abschnitt 2.8.4 beschrieben, realisiert. Abhängig von der Signalstärke, wurden die Röntgenfilme zwischen 1 – 120 min exponiert.
Radioaktive Sonden wurden durch PCR-vermittelten Einbau des radioaktiven Nukleotids [α-^{32}P]-dATP hergestellt. Zum PCR-Ansatz mit der entsprechenden Sondenmatrize wurde die Konzentration von dATP gesenkt, um dem Reaktionsansatz 1,85 MBq [α-^{32}P]-dATP hinzuzugeben. Nach Synthese der Sonden wurden Salze und Nukleotide durch Gelfiltration an einer Sephadex-G50-Matrix entfernt und die gewonnenen Eluate mittels Flüssigszintillationszähler auf ihre Radioaktivität hin überprüft. Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität wurden für die nachfolgende Hybridisierung verwendet. Hierfür wurden zunächst die freien Bindestellen der Nylonmembran für 2 h bei 65 °C im Hybridisierungspuffer [0,5 M NaP_i pH 7,2, 1 % (w/v) BSA, 7 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA] gesättigt. Die Hybridisierung der hitzedenaturierten, radioaktiven Sonden mit den auf der Nylonmembran fixierten DNA-Fragmenten erfolgte nach Zugabe von 2×106 dpm/ml der eluierten Sondenfraktion bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur über Nacht. Darauf wurde nicht gebundene Sonde durch jeweils 20 minütige Waschschritte entfernt: [2 × SSC, 0,1 % (w/v) SDS], [1 × SSC, 0,1 % (w/v) SDS], [0,5 × SSC, 0,1 % (w/v) SDS]. Die Detektion erfolgte unter Verwendung von Phosphorbildplatten am Bio-Imager nach 1 – 24 h Exposition.

2.6.14 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sequenzierungen doppelsträngiger DNA durch die Arbeitsgruppe von Prof. Heumann (Lehrstuhl Biochemie II, Ruhr-Universität Bochum) am „ABI 3130xl DNA Sequencer“ (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

2.7 Aufarbeitung und Aufreinigung von Proteinen

2.7.1 Gewinnung heterolog exprimierter Fusionsproteine aus *E. coli*

Für die Gewinnung von C-terminal doppeltmarkierten myc-$(His)_6$-Fusionsproteinen sowie von N-terminal markierten MBP-Fusionsproteinen wurden die Bakteriensedimente (2.5.3) für 20 min bei -80 °C eingefroren, auf Eis aufgetaut und anschließend im

Verhältnis 1 : 10 zum ursprünglichen Volumen in 50 mM NaP_i (pH 7,5) mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach Inkubation (30 min, auf Eis) wurden die Bakterien durch Ultraschallbehandlung (6 × 10 s mit Sonifier B-17 oder 30 min im Ultraschallbad Sonorex RK 510 S) auf Eis aufgeschlossen und durch anschließende Zentrifugation (15 min, 16 000 × g, 4 °C) Zelltrümmer sedimentiert. Der lösliche Überstand wurde verwahrt, die sedimentierten Bestandteile anschließend wieder in 50 mM NaP_i (pH 7,5) resuspendiert und ebenfalls verwahrt. Bei Bakterien, welche die Plasmide pMAL-p2x-YUC8-myc bzw. pMAL-p2x-YUC9-myc trugen und dementsprechend die exprimierten Proteine in das Medium sekretierten, wurde das Medium einer Methanolfällung unterzogen (2.7.4). Die gewonnenen Proteine wurden entweder mittels SDS-PAGE (2.8.2) analysiert bzw. durch Affinitätschromatographie (2.7.5, 2.7.5) weiter aufgereinigt.

2.7.2 Aufarbeitung von Proteinen aus *P. pastoris*

Nach der Anzucht (2.5.6) wurde der Überstand von *P. pastoris*, welche YUC8 bzw. YUC9 mit N-terminalem Sekretionssignal exprimieren (pPICZα-A-YUC8, pPICZα-A-YUC9), ohne weitere Aufarbeitung zur gelelektrophoretischen Analyse eingesetzt (2.8.2). Alternativ wurden die Proteine im Überstand mittels Methanolfällung im Vorfeld aufkonzentriert (2.7.4). Bei intrazellulär exprimierenden Konstrukten (pPICZ-B-YUC8, pPICZ-B-YUC9) wurden die Zellen zunächst in Aufschlusspuffer [50 mM NaP_i pH 7,4, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin] mit einer Kollektion von Proteasinhibitoren (2.7.3) und unter Verwendung von Glasperlen aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zellfragmente durch Zentrifugation (10 min, 16 000 × g, 4 °C) entfernt und der Überstand mit Hilfe der SDS-PAGE (2.8.2) aufgetrennt oder affinitätschromatographisch (2.7.5) weiter aufgereinigt.

2.7.3 Gewinnung von Proteinrohextrakt aus transgenen Pflanzen und Wurzelzellkulturen

Zur Extraktion von Proteinrohextrakt wurde Blattmaterial (100 mg/ml) von *A. thaliana* (2.5.8) in flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend in Aufschlusspuffer [50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 10 % (v/v) Glycerin] mit Protease-Inhibitor-Mix [0,37 mg/ml Aprotinin, 145 mM Benzamidin, 0,03 mM Leupeptin, 0,1 mg/ml Pepstatin A, 1 mM PMSF] bzw. mit dem Complete Protease-Inhibitor-Mix (beinhaltet Antipain, Bestatin, Chymostatin, E-64, Leupeptin, Pepstatin, Phosphoramidon, Pefabloc SC, EDTA und Aprotinin) nach Herstellerangaben (Roche) homogenisiert. Durch Zentrifugation (10 min, 16 000 × g, 4 °C)

wurden die unlöslichen Bestandteile der Zelle sedimentiert und die lösliche Proteinfraktion im Überstand für weitere Versuche verwahrt. Die sedimentierte Fraktion wurde anschließend im Verhältnis von 1 : 10 in Aufschlusspuffer resuspendiert und ebenfalls analysiert (2.8.2, 2.8.4).
Aus stabil transformierten *A.-thaliana*-Wurzelzellkulturen wurden nach Anzucht (2.5.7) 2 ml Aliquots sedimentiert (1 min, 16 000 × g, 4 °C) und jeweils mit 500 µl Aufschlusspuffer mit Protease-Inhibitor-Mix homogenisiert. Nach Zentrifugation (10 min, 16 000 × g, 4 °C) wurden der Überstand und das Sediment getrennt voneinander mittels Immundetektion auf exprimierte YUC8- bzw. YUC9-Fusionsproteine analysiert (2.8.4).

2.7.4 Proteinpräzipitation mittels Methanolfällung

Zur Fällung von Proteinen aus einer Lösung wurden die Proben im Verhältnis 1 : 2 mit eiskaltem Methanol versetzt und mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach anschließender Sedimentation (20 min, 16 000 × g, 4 °C) erfolgte eine Trocknung durch Vakuumzentrifugation der präzipitierten Proteine, um sie anschließend näher zu analysieren (2.8.2, 2.8.4).

2.7.5 Affinitätschromatographische Reinigung heterolog exprimierter Hexahistidin- und MBP-Fusionsproteine

Die gewonnenen Überstände (2.5.3, 2.5.6) wurden sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße), um Verunreinigungen der Säulen vorzubeugen. $(His)_6$-markierte Fusionsproteine wurden über eine Nickel-Nitrilotriessigsäure-(Ni^{2+}-NTA-)Matrix mit 4 ml Bettvolumen bei einer Säulenlaufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgereinigt [358]. Die Ni^{2+}-NTA-Chromatographie-Säule wurde mit 40 ml Aufgabepuffer [50 mM NaP_i, pH 7,5, 300 mM NaCl, 15 mM Imidazol] äquilibriert und anschließend der Extrakt aufgebracht. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mittels 15 ml Waschpuffer [50 mM NaP_i pH 7,5, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol] entfernt. Die fraktionsweise Elution der spezifisch gebundenen $(His)_6$-Fusionsproteine erfolgte mit 15 ml Elutionspuffer [50 mM NaP_i pH 7,5, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol]. Anschließend wurden die proteinhaltigen Fraktionen über PD-10-Einheiten nach Herstellerangaben (GE Healthcare Europe) in 50 mM NaP_i (pH 7,5) umgepuffert.
MBP-Fusionsproteine (2.5.3) wurden über eine Amylose-Matrix mit 3 ml Bettvolumen bei einer Säulenlaufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgereinigt. Die Äquilibrierung erfolgte mit 15 ml Amylose-Säulenpuffer [20 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT]. Daraufhin wurde der sterilfiltrierte Proteinextrakt aufgege-

ben, die Matrix mit 30 ml Amylose-Säulenpuffer gewaschen und mit 15 ml Amylose-Elutionspuffer [20 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Maltose] einzelne Fraktionen eluiert. Die eluierten Proben wurden anschließend auf ihren Proteingehalt (2.8.1) und ihren Reinheitsgrad (2.8.2) untersucht bzw. für enzymatische Aktivitätsstudien (2.9) eingesetzt.

2.8 Darstellung und Nachweis von Proteinen

2.8.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Reagenz [0,008 % (w/v) Serva Coomassie-Blau G 250, 5 % (v/v) Ethanol, 13 % (v/v) Phosphorsäure] photometrisch nach BRADFORD bestimmt [44]. Die Proteinmengen wurden aus dem linearen Bereich einer Rinderserumalbumin-Standardkurve berechnet.

2.8.2 Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen

Die Trennung von Proteingemischen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.8.1) wurden die Proben für 10 min bei 95 °C in SDS-Probenpuffer [50 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 20 % (v/v) Glycerin, 0,006 % (w/v) Bromphenolblau] denaturiert. Anschließend erfolgte die Elektrophorese in Apparaturen nach STUDIER über diskontinuierliche Gelsysteme, mit 12,5 % (w/v) Trenngelen nach LAEMMLI, bei einer Stromstärke von 20 mA [208, 379]. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine dienten entsprechende Gelelektrophoresemarker (2.1.3). Ausreichend getrennte Proteine wurden anschließend immunologisch weiter analysiert (2.8.4) oder die Proteine im Gel mittels Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung [0,01 % (w/v) Serva Blau R, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol] sichtbar gemacht. Überschüssiges Coomassie wurde mit Entfärbelösung [10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol] entfernt, das Gel für mindestens 2 h in Trocknerlösung [30 % (v/v) Methanol, 5,59 % (v/v) Glycerin] inkubiert und anschließend für 2 h bei 65 °C unter Vakuum zur Dokumentation getrocknet (2.13).

2.8.3 Elektrophoretischer Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membran

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (2.8.2) wurden in Anlehnung an TOWBIN *et al.* elektrophoretisch auf Nitrocellulose-Membran übertragen („Western-Transfer“) [403]. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer [20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % (v/v)

Methanol 0,01 % (w/v) SDS] für 2 h bei RT und einer Stromstärke von 200 mA oder über Nacht bei 4 °C und 60 mA. Die reversible Anfärbung mit Ponceau-S-Färbelösung [1 % (w/v) Ponceau-S, 2 % (v/v) Essigsäure] zeigte transferierte Proteine auf der Membran. Für eine Größenabschätzung nach der Immundetektion (2.8.4) wurden die Markerbanden markiert.

2.8.4 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Nach Immobilisierung der Proteine auf Nitrocellulose (2.8.3) wurden freie Bindestellen der Membran durch Inkubation für 2 h in TBSP [50 mM Tris/HCl pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1,5 % (w/v) Proteinpulver] gesättigt. Die Bindung des spezifischen Primärantikörpers (2.2.2) erfolgte im gleichen Puffer für 2 h. Nach Entfernen von überschüssigen Antikörpern durch zweimaliges Waschen für je 15 min mit TBST [50 mM Tris/HCl pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 0,5 % (v/v) Triton X-100] und TBS [50 mM Tris/HCl pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$] folgte eine einstündige Inkubation mit dem an alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper (2.2.2) in TBSP. Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges bzw. einmaliges Waschen mit TBST bzw. TBS entfernt. Nach Äquilibrierung der Membran in AP-Puffer [100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$] wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 330 µg/ml NBT und 165 µg/ml BCIP in AP-Puffer gestartet. Nach ausreichender Färbung wurden die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit Wasser gestoppt und die Ergebnisse digital dokumentiert (2.13).
Alternativ zu dem an alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper wurde zur sensitiven Detektion ein an Meerrettichperoxidase gekoppelter Sekundärantikörper verwendet (2.2.2). In diesem Fall erfolgte die Detektion der markierten Proteine mittels der Substrate SuperSignal West Pico bzw. SuperSignal West Femto nach Herstellerangaben (Pierce). Bei der katalytischen Umsetzung des Peroxidase-spezifischen Luminol-Reagenz entsteht eine Chemilumineszenz, welche einen Röntgenfilm an den jeweiligen Stellen belichtet. Die Exponierung der Röntgenfilme erfolgte zwischen 5 s und 5 min. Die anschließende Entwicklung und Fixierung wurde in einer Dunkelkammer manuell durchgeführt, um die Intensität der Färbung zu beeinflussen. Als Unterbrechung zwischen den Schritten und zur Spülung nach Fixierung wurde ein Wasserbad genutzt. Abschließend wurden die Filme luftgetrocknet und dokumentiert (2.13).

2.9 Untersuchung enzymatischer Aktivitäten

2.9.1 Analysen zur Cofaktorbindung rekombinanter Proteine mittels UV/VIS-Spektrometrie

YUC-Proteine gehören zu den Flavin-Monooxygenasen und benötigen zur enzymatischen Funktion Flavin als eingebauten Cofaktor [105, 455]. Zur Analyse des Cofaktor-Einbaus in die Apoproteine wurden Spektren der aufgereinigten Proteinfraktionen (2.7.5) am Photometer Beckmann DU-7000 von 280 – 750 nm in mehreren Verdünnungsreihen aufgenommen. Es wurde untersucht, ob die charakteristischen Flavin-Maxima bei 373 und 444 nm vorhanden sind. Als direkter Vergleich wurde reines FMN verwendet.

2.9.2 Aktivitätsstudien von affinitätschromatographisch gereinigten Proteinen zur Bestimmung der Substratspezifität

Die Aktivitätsstudien erfolgten mit affinitätschromatographisch aufgereinigten Proteinen (2.7.5) oder mit Proteinrohextrakt aus Pflanzen (2.7.3). Als mögliche Substrate wurden Tryptophan (Trp), Tryptamin (TAM), Indol-3-acetamid (IAM) und Indol-3-pyruvat (IPA) untersucht. Als Cofaktoren wurden $NADP^+$, NADPH, FAD und FMN verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml mit 100 mM KP_i pH 7, 3 mM Cofaktor, 3 mM Substrat, 20 µg aufgereinigtem Protein bzw. 20 – 300 µg pflanzlichem Proteinrohextrakt. Die Cofaktoren wurden in verschiedenen Kombinationen eingesetzt. Die Reaktionstemperaturen betrugen 15 °C oder 37 °C mit Inkubationszeiten zwischen 15 min und über Nacht. Als Kontrollen dienten Proben mit H_2O anstatt Protein und inaktiviertes Protein (15 min bei 95 °C). Um mögliche Enzymaktivitäten zu quantifizieren, wurde das $NADP^+$/NADPH-Spektrum am Photometer Kontron Uvikon 933 bei 340 nm dokumentiert. Zur Analyse abnehmender Edukte und/oder entstehender Produkte wurden die Reaktionsansätze anschließend dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (2.9.3).

2.9.3 Dünnschichtchromatographische Studien

Die Reaktionsansätze aus den Aktivitätsstudien 2.9.2 wurden durch Vakuumzentrifugation bei 45 °C auf 60 µl eingeengt und jeweils 20 µl auf Polygram® SIL G/UV_{254} DC-Fertigplatten aufgetragen. Nach Trocknung wurden die DC-Platten in Chromatographietanks mit dem entsprechenden Laufmittel [Ethylacetat : Methanol : Ammoniak im Verhältnis 45 : 35 : 20 (v/v)] inkubiert. Nach ausreichender Trennung wurden die Platten mit 0,2 % (w/v) Ninhydrin in Ethanol besprüht und bei 100 °C entwickelt, um

die Aminogruppen sichtbar zu machen. Als Vergleich dienten die eingesetzten und gleichzeitig aufgetrennten Substrate und Cofaktoren in Reinsubstanz.

2.10 GC-MS/MS-Bestimmung freier und konjugierter IES

Der Nachweis erfolgte in Anlehnung an MÜLLER *et al.* [258]. Zur Probenaufbereitung wurde 50 – 100 mg steril angezogenes Pflanzenmaterial (2.5.8) mit 1 ml IES-Standard in Methanol [30 pmol/ml $[^2H]_2$-IES für die freie IES und 2 nmol/ml $[^{13}C]_6$-IES für die gesamte IES] versetzt und nach Inkubation (15 min, 60 °C) in der Schwingmühle MM 300 für 20 min bei 25 Hz homogenisiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer sedimentiert (2 min, 16 000 × g) und der Überstand in der Vakuumzentrifuge Concentrator 5301 bei 60 °C getrocknet. Nach Teilung der Proben für die Bestimmung von freier IES (75 % der Probe) bzw. gesamter IES (25 % der Probe) erfolgte die alkalische Hydrolyse und Vorreinigung (durch Flüssig-Flüssig-Extraktion) des Gesamte-IES-Aliquots. Für die darauf folgende Festphasenextraktion wurden Aminopropyl-modifizierte Kieselgel-Säulen in Diethylether äquilibriert. Hiernach wurden die Proben mittels Ultraschall in 0,2 ml Diethylether resuspendiert, der ungelöste Anteil abzentrifugiert (2 min, 16 000 × g) und der Überstand anschließend über jeweils eine Säule gegeben. Kurz bevor die Säule trockenlief, erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Waschlösung [Chloroform : Isopropanol im Verhältnis 2 : 1 (v/v)]. Die Eluatfraktion wurde nach Aufgabe von 0,4 ml 2 % (v/v) Essigsäure in Diethylether erhalten und anschließend vollständig getrocknet. Zur Methylierung wurde den Proben 20 µl Methanol und 100 – 150 µl etherische Diazomethanlösung hinzugegeben, 10 s gemischt und im Stickstoffstrom überschüssiges Diazomethan entfernt. Nach Überführung der Lösung in GC-MS-Gefäße, Trocknen im Stickstoffstrom und Lösen in 10 µl Chloroform erfolgte die IES-Bestimmung anhand von 1 µl automatisch injizierter Probe (Probengeber CombiPAL, Gaschromatograph CP-3800, Massenspektrometer Saturn 2000).

Die Messungen fanden unter folgenden Bedingungen statt: splitlose Injektion; 250 °C Injektortemperatur; Trägergas Helium (Vordruck 80 kPa); Trennsäule ZB-50 (30 m Länge, 0,25 mm Durchmesser, 0,25 µm Schichtdicke der stationären Phase); Säulenofen-Temperaturprogramm: 1 min 50 °C, 40 °C/min auf 150 °C, 6 min konstant, 20 °C/min auf 250 °C, 6 min konstant; Temperatur des Transferbereichs: 250 °C; Messbereich (m/z): 100 – 200. Anhand der MS/MS-Messungen, der aus den Mutterionen (m/z 190 für freie IES, 192 für den Freie-IES-Standard bzw. 196 für den Gesamte-IES-Standard) entstandenen Fragmentionen (m/z 130, 132 bzw. 136) konnte durch direkten Vergleich der entsprechenden Signalflächen, unter Berücksichtigung der Einwaagen, die jeweilige

IES-Konzentration in pmol IES/g Frischmasse bestimmt werden. Die konjugierte IES ergibt sich hierbei aus der Differenz der Gesamt-IES und der freien IES.

2.11 Histochemischer GUS-Nachweis von Reportergenaktivitäten

Mit Hilfe von Promotor-Reportergenkonstrukten können Rückschlüsse auf die gewebespezifische Expression des entsprechenden Gens erstellt werden. Hierfür wurden mehrere Linien von *YUC8*gus und *YUC9*gus (2.4.2) untersucht. Die GUS-spezifische Färbereaktion erfolgte in Anlehnung an JEFFERSON *et al.* [175]. Entsprechendes Gewebe oder ganze Pflanzen bzw. Keimlinge wurden in eiskaltes 90 % (v/v) Aceton gegeben und auf Eis gehalten, bis die Probennahme abgeschlossen war. Anschließend wurden die Proben für 10 min vakuuminfiltriert und darauf für 30 Minuten bei RT inkubiert, um den Chlorophyll-Anteil zu reduzieren. Die Acetonlösung wurde durch GUS-Waschpuffer [50 mM Citratpuffer pH 7, 1 mM Ferro, 1 mM Ferri, 0,1 % (v/v) Triton X-100] ausgetauscht und die Proben erneut für 10 min vakuuminfiltriert. Schließlich wurde der GUS-Waschpuffer mit der GUS-Färbelösung [50 mM Citratpuffer pH 7, 1 mM Ferro, 1 mM Ferri, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,5 mM X-Gluc] ersetzt und für zwei Zyklen von 15 min Dauer ein Vakuum angelegt, bis aus den Gewebeproben keine Luftbläschen mehr entwichen. Die eigentliche Färbereaktion fand je nach Gewebe für 6 – 16 h bei RT im Dunkeln statt. Anschließend erfolgte die restliche Extrahierung von verbliebenem Chlorophyll mit Ethanolwaschschritten (20 %, 35 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % (v/v)) von je 30 min Dauer. Nach dem Waschschritt mit 50 % (v/v) Ethanol wurde zunächst das Gewebe für 30 min in FAA-Puffer [50 % (v/v) Ethanol, 3,7 % (v/v) Formaldehyd, 5 % (v/v) Essigsäure] fixiert. Für mikroskopische Analysen (2.13) im Detailbereich wurden die Gewebeproben über Nacht in Chloralhydratlösung [2,5 g Chloralhydrat/ml 30 % (v/v) Glycerol] geklärt [224] und anschließend in 30 % (v/v) Glycerol bei 4 °C gelagert.

2.12 Bestimmung der Lignifizierungsintensität

2.12.1 Qualitativer Ligninnachweis mittels Phloroglucin/HCl-Färbung

Der Ligninnachweis erfolgte mittels der Wiesner-Reaktion (Phloroglucin/HCl-Färbung) [4]. Es wurden 3 ml Phloroglucin-Lösung [5 % (w/v) Phloroglucin, 50 % (v/v) Ethanol] in eine Petrischale gegeben und die getrockneten Pflanzenteile für 1 min darin inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml konzentrierter Salzsäure startete die Färbereaktion. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Pflanzenteile in Wasser gewaschen und anschließend analysiert (2.13).

2.12.2 Gewinnung von Zellwandmaterial und quantitative Ligninbestimmung durch Thioglycolsäure-Derivatisierung

Zur Herstellung von Zellwandmaterial wurden 100 – 400 mg Pflanzenteile eingewogen, 800 µl Homogenisationspuffer [50 mM Tris/HCl pH 8,3, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 M NaCl] hinzugegeben und in einer Schwingmühle 3×15 s homogenisiert. Die unlöslichen Zellwandbestandteile wurden sedimentiert (10 min, 8 000 × g) und jeweils zweimal in 1 ml Homogenisationspuffer, 80 % (v/v) Aceton und 100 % (v/v) Aceton gewaschen. Anschließend erfolgte die Trocknung des Zellwandmaterials und die Bestimmung der Trockenmasse.

Die Thioglycolsäure-Derivatisierung erfolgte in Anlehnung an BRUCE und WEST und MÜSE *et al.* [49, 263]. Hierfür wurde das ligninhaltige Sediment mit 1 ml 2 M HCl und 0,2 ml Thioglycolsäure versetzt und für 4 h bei 95 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 16 000 × g) wurde das Sediment gewaschen (3×1 ml H_2O), in 1 ml 0,5 M NaOH aufgenommen und bei 25 °C im Thermomixer über Nacht inkubiert. Die lösliche Phase wurde von den restlichen Zellwandfragmenten getrennt (5 min, 16 000 × g), mit 0,3 ml HCl versetzt und für 4 h bei 4 °C inkubiert. Durch erneute Zentrifugation (5 min, 16 000 × g) konnte das Lignin-Thioglycolsäure-Derivat sedimentiert werden. Für die Quantifizierung wurde dieses in 1 ml 0,5 % (v/v) NaOH gelöst und die Extinktion am UV-Spektrometer bei 280 nm dokumentiert. Für die Berechnung des Lignins wurde ein spezifischer Absorptionskoeffizient verwendet, der aus einer parallel durchgeführten Eichgeraden mit 0 – 100 µg Alkalilignin erhalten wurde.

2.13 Makro- und mikroskopische Analysen und digitale Dokumentation

Phänotypische Ausprägungen von *A.-thaliana*-Mutanten (2.4.2, 2.5.14), transient transformierten *N.-benthamiana*-Pflanzen (2.5.9) und Membranen nach immunologischem Nachweis (2.8.4) wurden mit den Digitalkameras Nikon Coolpix 990, Nikon D200 und Sony DSC-P200 dokumentiert. Coomassie-gefärbte SDS-Gele (2.8.2) wurden mit dem Scanner Medion MD 41985 digital erfasst.

GUS-gefärbte Keimlinge, Blüten und Schoten (2.11) wurden vorher auf einem Objektträger aufgebracht, mit einem Tropfen der entsprechenden Pufferlösung versehen, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mittels des Stereomikroskops Leica MZ12 unter Zuhilfenahme der Spiegelreflexkamera Nikon D200 mit dem Adapter LM Digital SLR analysiert. Beobachtungen der phänotypischen Ausprägungen von Überexpressions-

pflanzen (Blüten, Dickenwachstum, Schoten, Samen) und Lignin-gefärbten Schnitten (2.12.1) wurden ebenfalls mit dem Stereomikroskop Leica MZ12 dokumentiert.
Die Untersuchung von Epidermiszellschichten (2.5.10), GUS-gefärbten Wurzelspitzen und sich entwickelnden Seitenwurzeln (2.11) wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 100 im Durchlicht unter Zuhilfenahme der Mikroskopkamera AxioCam MRc analysiert und mit Hilfe der Software AxioVision (Version 4.72, Zeiss, Jena) ausgewertet.
Nach biolistischer Transformation pflanzlicher Epidermiszellen (2.5.12) erfolgten die Voruntersuchungen der subzellulären Lokalisation von GFP-markieren YUC8- bzw. YUC9-Proteinen ebenfalls mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 100. Die abschließenden Analysen wurden mittels des konfokalen „Laser-Scanning"-Mikroskops LSM 510 META in Anlehnung an POLLMANN *et al.* [298] durchgeführt und mit der zugehörigen Software digital erfasst. Als Lokalisationskontrolle wurden die entsprechenden GFP-Leervektoren verwendet. Die Exzitation bei 488 nm erfolgte unter Verwendung eines Krypton-Argon-Lasers. Die dadurch angeregten GFP-Fluorophore wurden bei 500 – 530 nm bzw. die dadurch angeregte Chlorophyll-Autofluoreszenz bei 650 – 798 nm detektiert. Die spätere Auswertung erfolgte mit der Software LSM Image Browser (Version 4.2, Zeiss, Jena). Die Bearbeitung und Vermessung der dokumentierten Bilder wurde mit entsprechender Software durchgeführt (2.15)

2.14 Statistische Auswertung

Zur Veranschaulichung der Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse wurde als beschreibendes Maß die Standardabweichung (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

bzw. als statistisches Maß der Standardfehler (SEM)

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

in den Diagrammen angegeben.
Zur Signifikanzermittlung wurde als Hypothesentest ein Zweistichproben-t-Test für zwei unabhängige Stichproben durchgeführt. Anhand der Stichproben $x_1, x_2, ..., x_n$ und

$y_1, y_2, ..., y_m$ mit den Stichprobenmittelwerten $\bar{x}, \bar{y}$ und den Stichprobenvarianzen s_x^2, s_y^2 wurde über die gewichtete Varianz (s^2)

$$s^2 = \frac{(n-1)s_x^2 + (m-1)s_y^2}{n+m-2}$$

die Prüfgröße (t)

$$t = \sqrt{\frac{nm}{n+m}} \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s}$$

ermittelt. Als Signifikanzniveau α wurde das 0,95-Quantil bzw. das 0,99-Quantil der t-Verteilung mit $n + m - 2$ Freiheitsgraden zugrunde gelegt. Ist demnach $|t| \leq t(0,95; n+m-2)$ bzw. $|t| \leq t(0,99; n+m-2)$ wird von einer 95 % bzw. 99 % Konfidenz gesprochen, dass sich die ermittelten Ergebnisse unterscheiden. Das Ergebnis des statistischen Signifikanztests wird in den Abbildungen als p-Wert angegeben. Hierbei gibt p an, wie wahrscheinlich die Nullhypothese (H_0) ist, dass die Messungen untereinander keinen Effekt aufweisen. Entsprechend wird bei $p \leq 0,05$ von signifikanten und bei $p \leq 0,01$ von hochsignifikanten Unterschieden ausgegangen. Die Stichprobenwerte stammen, wenn nicht anders angegeben, aus dem arithmetischen Mittel von drei unabhängigen Messungen.

2.15 Sequenzanalysen und Bildbearbeitung

Sequenzanalysen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus nach ALTSCHUL *et al.* [7] und dem Programm DNAMAN (Version 5.2.2, Lynnon BioSoft, Quebec, Kanada) durchgeführt. Zur Auswertung der Sequenzierungsergebnisse diente die Software Sequence Scanner (Version 1.0, Applied Biosystems, Darmstadt). Als weitere Analyse- und Datenbanksoftware stand das Programm Vector NTI Advance (Version 10.3.0, Invitrogen, Karlsruhe) zur Verfügung.
Studien zur gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression sowie Untersuchungen zur Abhängigkeit von Tageszeitpunkt, Licht und Temperatur wurden mittels
– Genevestigator V3 (`https://www.genevestigator.ethz.ch/`),
– AtGenExpress (`http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp`) und
– Diurnal (`http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/`) durchgeführt [167, 253, 341].
Um die mögliche Promotorregion einzugrenzen, erfolgten Analysen zu pflanzlichen *cis*-Elementen mit Hilfe von
– PlantCARE (`http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/`),

– SeqVISTA 1.81 (http://zlab.bu.edu/SeqVISTA/) und
– PLACE 30 (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/) [162, 168, 217].
Vorhersagen über spezifische Phosphorylierungsstellen sowie Homologieuntersuchungen anhand der Aminosäuresequenz erfolgten unter Verwendung von
– NetPhos 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) und
– ClustalW 2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/) [36, 211].
Recherchen wurden insbesondere mit Unterstützung der Datenbanken von
– TAIR (http://www.arabidopsis.org/) und
– NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) durchgeführt [312, 337].
Die Vermessung und Bearbeitung von Abbildungen erfolgte hauptsächlich mit ImageJ [309], Adobe Photoshop (Version CS4, Adobe, München) und CorelDRAW (Version X4, Corel, Unterschleißheim). Auf eine inhaltsgetreue Wiedergabe wurde geachtet.

3 Ergebnisse

Es ist bekannt, dass pflanzliche Entwicklungsabläufe durch Phytohormone reguliert werden. Beispielsweise wird das Wachstum einer Pflanze maßgeblich durch das Auxin Indol-3-essigsäure (IES) beeinflusst. Bei Reaktionen auf Stressfaktoren spielen hingegen die sogenannten Octadecanoide und hier besonders die 12-Oxophytodiensäure (OPDA) und die Jasmonsäure (JA) eine wichtige Rolle. Neben diesen gibt es noch eine Reihe weiterer Phytohormone, welche nicht nur isoliert voneinander wirken, sondern auch in Wechselwirkung miteinander stehen.
Differentielle Studien zur Genexpression zeigten in der Octadecanoid-behandelten *aos/opr3*-Doppelmutante eine Hochregulation von *YUC8* und *YUC9*. Beide Gene sind aufgrund ihrer Homologie zu bereits beschriebenen *YUC*-Mitgliedern womöglich an der Auxinbiosynthese beteiligt. Vor Beginn dieser Arbeit war eine physiologische Verknüpfung zwischen Octadecanoiden und Auxin zwar bekannt [151, 386], jedoch ist eine spezifische Octadecanoid-Induktion von Auxinbiosynthesegenen und damit der direkten Beeinflussung des Auxingehalts nicht beschrieben. Das Zusammenwirken dieser Signalstoffe durch eine direkte Modulation der Biosynthese würde ein breites Funktionsspektrum für die pflanzliche Entwicklung sowie schnelle und gezielte Reaktionen auf biotische und abiotische Umweltreize ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von genetischen und molekularbiologischen Methoden die physiologische Funktion von *YUC8* und *YUC9* in *A. thaliana* und ihre Rolle hinsichtlich einer Octadecanoid-induzierten Auxinbiosynthese untersucht.

3.1 Expression, Aufreinigung und enzymatische Analysen zur Substratspezifität von YUC8 und YUC9

Neben der entwicklungsabhängigen und umgebungsbedingten Steuerung ist die ungeklärte enzymatische Funktion von YUC8 und YUC9 von besonderem Interesse. In vorherigen Arbeiten wurden bereits Versuche zur Aufreinigung von löslichen YUC8-Proteinextrakten unternommen [161]. Neben dem pTrcHis2-Expressionssystem zur heterologen Expression von C-terminal doppeltmarkierten myc-$(His)_6$-Fusionsproteinen wurden auch N-terminale GST-Fusionen verwendet, um die Löslichkeit zu erhöhen [357]. Anpassungen der Expressionsbedingungen wie Temperatur, Induktorkonzentration, Induktionszeitpunkt, Expressionsdauer oder der Versuch, die Fusionsproteine durch Triton X-100 zu solubilisieren, brachten ebenso keine Verbesserung wie die Co-Expression von Faltungshelfern, sogenannten Chaperonen. Von diesem Wissen ausgehend, wurden

im Rahmen dieser Arbeit weitere Versuche zur Gewinnung löslicher YUC8- bzw. YUC9-Fusionsproteine unternommen, um Substratanalysen und Aktivitätsstudien durchführen zu können.

3.1.1 Überexpression von MBP-Fusionsproteinen in *Escherichia coli*

Zur Optimierung der Löslichkeit und zum Vergleich mit den proteinbiochemischen Studien von YUC1 und YUC6 [190, 455] wurden Konstrukte mit N-terminalen Fusionen des Maltosebindeproteins (MBP) [21] erstellt. Die Klonierungsstrategie ist im Anhang in Abbildung 6.1 gezeigt. Die fertigen Konstrukte sollten nach IPTG-Induktion zu einer Überproduktion von MBP:YUC8:myc- bzw. MBP:YUC9:myc-Fusionsproteinen führen, wobei der MBP-Anhang durch eine Protease-Schnittstelle (PCS) entfernt werden kann. Durch die *malE*-Signalsequenz wurde bei den pMAL-p2x-Konstrukten zudem eine Sekretion in das Periplasma angestrebt.

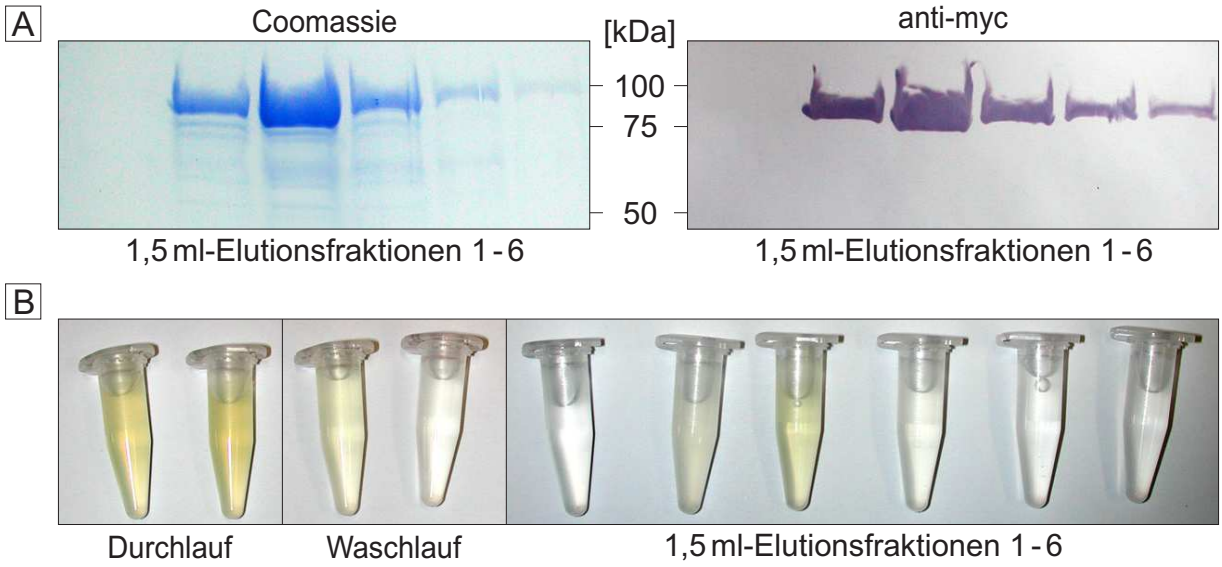


Abb. 3.1: Aufreinigung heterolog exprimierter MBP:YUC8:myc-Fusionsproteine
Nach Transformation von pMAL-c2x-YUC8-myc (Abb. 6.1) in *E. coli* (2.5.2), Anzucht (4,5 h Inkubation bei 30 °C, Induktion bei OD_{600} von 0,65 mit 0,2 mM IPTG, siehe 2.5.3) und Aufarbeitung (2.7.1) wurden die MBP-Fusionsproteine säulenchromatographisch gereinigt (2.7.5) und nach SDS-PAGE mittels Coomassie-Färbung (2.8.2) und anti-myc-Immundetektion (2.8.4) analysiert (A). Die Färbung der Elutionsfraktionen wurde zusätzlich digital dokumentiert (B).

Studien zur heterologen Expression von MBP-Fusionsproteinen wurden sowohl für YUC8 als auch YUC9 durchgeführt. Fusionsproteine, welche durch pMAL-p2x-Konstrukte in das Periplasma sezerniert werden sollten, konnten trotz Aufkonzentrierung der Proteine (2.7.4) nicht nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Eine erfolgreiche

Überexpression konnte jedoch für pMAL-c2x-YUC8-myc und pMAL-c2x-YUC9-myc erreicht werden. Abbildung 3.1 zeigt die Ergebnisse exemplarisch für MBP:YUC8:myc. Durch die Affinität der MBP-Fusionsproteine zu Amylose konnten diese unter nativen Bedingungen mit einer Amylose-Säulenchromatographie präparativ aufgereinigt werden (2.7.5). Die Coomassie-gefärbten SDS-Gele und die Immundetektion zeigten, dass MBP:YUC8:myc nach Aufarbeitung größtenteils löslich exprimiert wurde (2.7.1 A). Die 1,5 ml-Elutionsfraktionen wiesen nach Immundetektion insbesondere in der dritten Fraktion den höchsten Anteil an rekombinantem Fusionsprotein auf. Bei den zusätzlichen niedermolekularen Banden handelte es sich um C-terminal degradierte Abbauprodukte des Fusionsproteins, welche durch einen spezifischen MBP-Antikörper nachgewiesen wurden (ohne Abbildung). Im Vergleich zu den anderen Elutionsfraktionen zeigten die zweite und dritte Fraktion eine Gelbfärbung auf. Dies könnte an einem erhöhten FAD-Anteil liegen (2.7.1 B). Die Resultate für die YUC9-Konstrukte waren vergleichbar.

3.1.2 Heterologe Expressionsstudien in der Hefe *Pichia pastoris*

Eine weitere Strategie zur Aufreinigung funktioneller Fusionsproteine war die Überexpression in dem eukaryotischen Organismus *P. pastoris*. Um die Herstellung rekombinanten Proteins in der Hefe zu gewährleisten, wurden zwei Strategien verfolgt. Die pPICZα-Konstrukte führen durch den α-Faktor zu einer Sekretion in das Medium, während mittels pPICZ-B exprimierte Proteine im Cytoplasma verbleiben. Die Klonierungsstrategie zur Expression von YUC8- und YUC9-Fusionsproteinen ist im Anhang in Abbildung 6.2 dargestellt.
Die erstellten Konstrukte pPICZα-A-YUC8, pPICZα-A-YUC9, pPICZ-B-YUC8 und pPICZ-B-YUC9 wurden in *P. pastoris* X-33 transformiert und auf positive Transformanden selektioniert (2.5.5). Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass Transformanden befähigt sind, Methanol zu verstoffwechseln, um so eine spätere Methanol-Induktion zu gewährleisten. Nach Anzucht (2.5.6) und anschließender Aufarbeitung (2.7.2) wurde mittels SDS-PAGE (2.8.2) und Immundetektion (2.8.4) versucht, rekombinante YUC8- bzw. YUC9-Fusionsproteine zu detektieren. Trotz Änderung verschiedener Parameter nach Herstellerangaben (Invitrogen) und Anpassung der Aufarbeitungsmethoden konnten für beide Systeme keine Fusionsproteine nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

3.1.3 Homologe Expression in *Arabidopsis*-Wurzelzellkulturen

Zur Gewährleistung optimaler Expressionsbedingungen und dennoch der Möglichkeit YUC8 und YUC9 in großem Maßstab zu exprimieren, wurden homologe Expressions-

studien in *A.-thaliana*-Wurzelzellkulturen durchgeführt. Hierfür wurden sowohl eine *35S*-Promotor-gesteuerte Variante als auch das pN-TAP-System verwendet. Die Klonierungsstrategie der beiden Expressionssysteme findet sich in Abbildung 6.3 für die Variante mit einfachem *35S*-Promotor sowie in Abbildung 6.4 für das pN-TAP-System. Nach *Agrobacterium*-vermittelter Transformation in Wurzelzellkulturen und Anzucht zur ektopischen Expression (2.5.7) erfolgte die Aufarbeitung der Zellkulturen (2.7.3). Bei den mit pD1-35S-YUC8-myc transfizierten Zellen konnte weder im Sediment noch im Überstand ein Signal von YUC8:myc detektiert werden. Ein Proteinnachweis konnte lediglich für TAP:YUC8-Fusionsproteine, jedoch nur im Sediment, erbracht werden (ohne Abbildung). Veränderte Aufarbeitungsbedingungen führten zu keiner Verbesserung der Löslichkeit.

3.1.4 Dünnschichtchromatographische und photometrische Studien zur enzymatischen Aktivität

Aufgereinigte MBP-Fusionsproteine von YUC8 und YUC9 zeigten eine leichte Gelbfärbung (Abb. 3.1 B). Dies lässt auf einen erhöhten Anteil von Flavin schließen, welches als prosthetische Gruppe für die enzymatische Funktion von Flavin-Monooxygenasen zwingend erforderlich ist. Zur Analyse der Cofaktorbindung wurden die aufgereinigten Proteinfraktionen photometrisch auf ihren Flavin-Anteil überprüft (2.9.1). Die Ergebnisse der photometrischen Analyse sind in Abbildung 3.2 beispielhaft für MBP:YUC8 dargestellt. Während die FMN-Kontrolle die typischen Flavin-Maxima aufwies, zeigte MBP:YUC8 keinen Anstieg in diesem Spektralbereich. Spektrometrische Messungen mit MBP:YUC9 zeigten ebenfalls keine Flavin-Maxima.
Dennoch wurden mit Hilfe der löslichen MBP-Fusionsproteine (3.1.1) Substratanalysen durchgeführt. Nach Aufreinigung der MBP-Fusionsproteine (2.7.5) wurden die Proteinfraktionen nach Abschnitt 2.9.2 auf mögliche Aktivität untersucht. Da weder für YUC8 noch für YUC9 die Substratspezifität bekannt ist, erfolgten die Analysen mit einer Reihe möglicher Substrate. Flavin-Monooxygenasen, wie YUC8 und YUC9, benötigen für ihre katalytische Aktivität NADPH als Cofaktor, welches zu $NADP^+$ oxidiert wird [105]. Bei einer enzymatischen Reaktion nimmt das Spektrum von NADPH im Bereich von 340 nm ab, wodurch photometrisch eine mögliche Aktivität untersucht werden kann (2.9.2). Trotz verschiedener Optimierungen war keine Veränderung im NADPH-Spektrum erkennbar (ohne Abbildung). Anschließend wurden die Reaktionsansätze dünnschichtchromatographisch aufgetrennt, um eine mögliche Umsetzung der Edukte

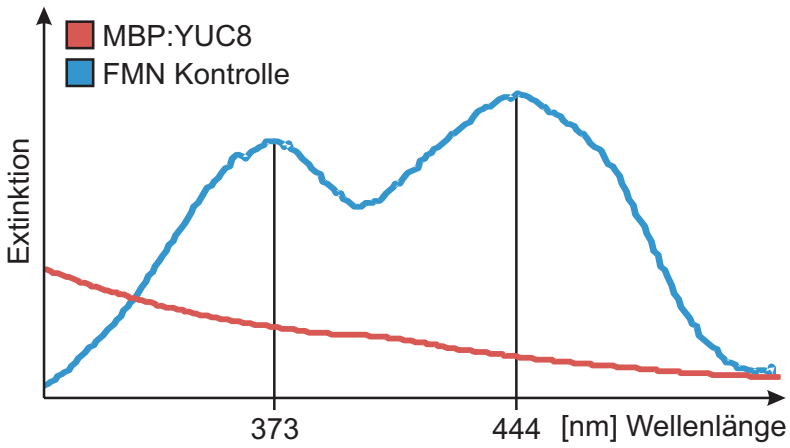


Abb. 3.2: Photometrische Analysen zur Bestimmung der FAD-Inkorporation heterolog exprimierter MBP:YUC8-Fusionsproteine
UV/VIS-Spektrum (280 – 750 nm; 2.9.1) von aufgereinigtem MBP:YUC8 (rot) und FMN (blau) als Flavin-Kontrolle. Die charakteristischen Flavin-Maxima bei 373 und 444 nm sind gekennzeichnet.

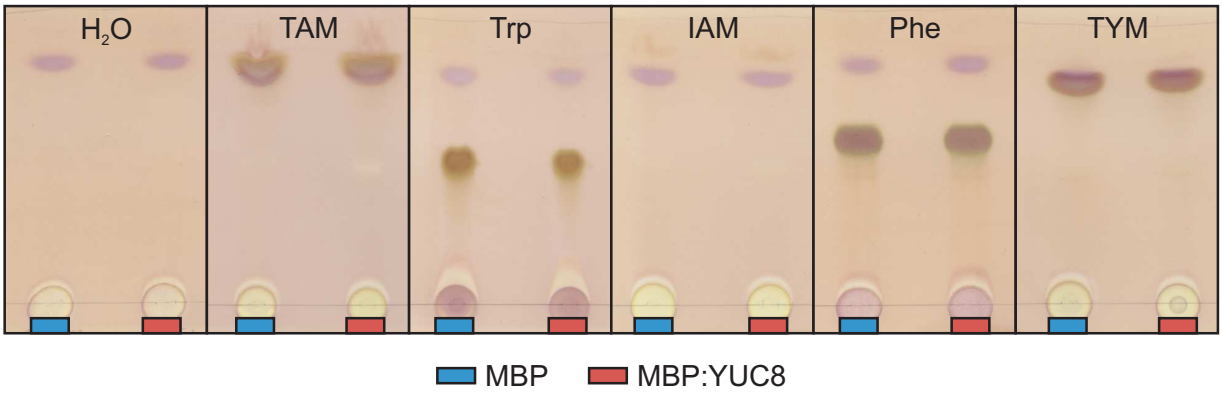


Abb. 3.3: Dünnschichtchromatographische Analysen zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von YUC8
Dargestellt ist eine Auswahl dünnschichtchromatographischer Auftrennungen (2.9.3) nach Inkubation der Reaktionsansätze zur Bestimmung der Substratspezifität von YUC8 (2.9.2). Das jeweilige Reaktionsvolumen betrug 1 ml mit 100 mM KP_i, pH 7, 3 mM Cofaktor ($NADP^+$, NADPH und FAD), 3 mM Substrat sowie 20 µg MBP:YUC8 (rot). Die Reaktion verlief bei 30 °C über Nacht. Aufgereinigtes MBP (blau) diente als Kontrolle. [TAM - Tryptamin, Trp - Tryptophan, IAM - Indol-3-acetamid, Phe - Phenylalanin, TYM - Tyramin]

zu analysieren (2.9.3). Ausgewählte Analysen sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Eine Veränderung der Reaktionsbedingungen, Cofaktoren und eine Erweiterung des Substratspektrums (2.9.2) führten zu keinem Aktivitätsnachweis von MBP:YUC8. Identische Analysen mit gleichen Resultaten erfolgten auch für MBP:YUC9 (ohne Abbildung). Es wurden ebenfalls enzymatische Studien mit zellfreiem Proteinrohextrakt (2.7.3) aus Überexpressionspflanzen (*YUC8*ox, *YUC9*ox, *YUC8*tap, *YUC9*tap) sowie Wurzelzellkulturen mit pN-TAP-YUC8 durchgeführt. Jedoch konnte unter den getesteten Bedingungen keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

3.2 Spezifische Genexpression von *YUC8* und *YUC9* in *Arabidopsis thaliana*

Die Octadecanoid-Induzierbarkeit von *YUC8* und *YCU9* wurde mit Hilfe von differentiellen Genexpressionsstudien in einer *A. thaliana aos/opr3*-Nullmutante nachgewiesen. Mit Hilfe von Transkriptanalysen wurde die Induzierbarkeit u.a. von *YUC8* und *YUC9* in *A. thaliana* Col-0-Wildtyppflanzen verifiziert. Zusätzlich sollten gewebespezifische und kinetische Studien sowie Transkriptanalysen mit weiteren Nullmutanten Aufschluss über die Regulationsmechanismen und die physiologische Funktion geben.

3.2.1 Quantifizierung gewebe- und entwicklungsspezifischer *YUC8*- und *YUC9*-Transkriptgehalte

Für ein generelles Verständnis über die physiologische Relevanz von *YUC8* und *YUC9*, wurde zunächst ein differentielles Transkriptionsprofil unter standardisierten Bedingungen in verschiedenen Geweben und in unterschiedlichen Entwicklungsstadien durchgeführt. Zur Untersuchung der entwicklungsabhängigen Bedeutung wurden die Transkriptgehalte in steril angezogenen 3, 7, 14 bzw. 21 Tage alten Keimlingen untersucht (2.5.8). Weiterhin wurden Wurzeln, junge Blätter, alte Blätter, Stängel und Blüten analysiert, um nähere Hinweise auf mögliche organspezifische Entwicklungs- und Wirkfunktionen zu erhalten. Die Analysen erfolgten sowohl mittels semiquantitativer (2.6.10) als auch quantitativer Methoden (2.6.11). Die Quantifizierung der relativen Genexpression von *YUC8* und *YUC9* ist in Abbildung 3.4 zusammengefasst.
Mit den verwendeten Oligonukleotiden konnte relativ für *YUC8* gesehen mehr Transkript bestimmt werden als für *YUC9*. Jeweils für sich betrachtet wurden beide Gene verstärkt in jungen Keimlingen transkribiert. Während die *YUC8*-Genexpression insbesondere bei sehr jungen Keimlingen erhöht war, erreichte die Genexpression von *YUC9*

nach sieben Tagen ihr Maximum. Auf den kompletten Keimling bezogen nahmen die Transkriptgehalte anschließend wieder ab. In den Geweben zeigte sich bei beiden, insbesondere bei *YUC9*, eine erhöhte Transkriptmenge in den Wurzeln. Der Transkriptgehalt von *YUC8* war besonders in jungen und in alten Blättern sowie in den Blüten erhöht.

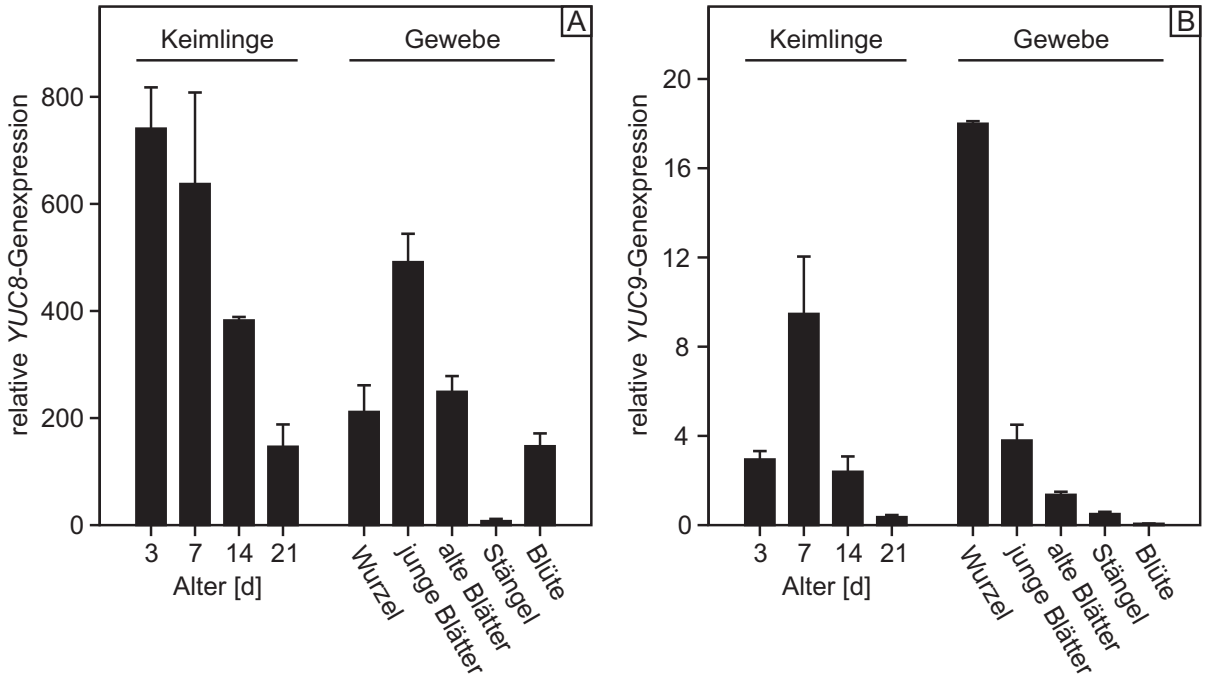


Abb. 3.4: *YUC8*- und *YUC9*-Genexpression in Keimlingen und in Geweben adulter Pflanzen
Dargestellt ist die Quantifizierung der *YUC8*- (A) und *YUC9*-Transkripte (B) in *A. thaliana* Col-0-Wildtyp. Analysiert wurden die Gehalte von Keimlingen unterschiedlichen Alters sowie einzelner Gewebe von sechs Wochen alten Pflanzen. Die Poly(A)$^+$-mRNA von Keimlingen bzw. den entsprechenden Geweben wurde aufgearbeitet (2.6.7) und in cDNA umgeschrieben (2.6.8) Unter Verwendung der Referenzgene *EF-1α*, *APT1* und *UBQ10* erfolgte die Transkript-Quantifizierung von *YUC8* und *YUC9* mittels „Real-Time"-PCR-Analysen und anschließender statistischer Auswertung (2.6.11). [Fehlerbalken $\pm SD$]

3.2.2 *YUC8*- und *YUC9*-Transkriptveränderungen in Wildtyppflanzen und Funktionsmutanten nach Behandlung mit Induktoren

Induktionsversuche mit der JA- und OPDA-defizienten *aos/opr3*-Nullmutante dienten zur Verifikation der in den Vorarbeiten durchgeführten Gen-Chip-Analysen [40]. Mit Hilfe der JA-Signalperzeptions-defizienten *coi1*-Nullmutante sollten weitere Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge der Octadecanoid-Induzierbarkeit gewonnen werden. In der *aos/opr3*-Doppelmutante (Abb. 3.5 A) zeigte sich eine OPDA-Induzierbarkeit für *YUC8*, nahezu keine Veränderung nach MeJA-Gabe und eine schwa-

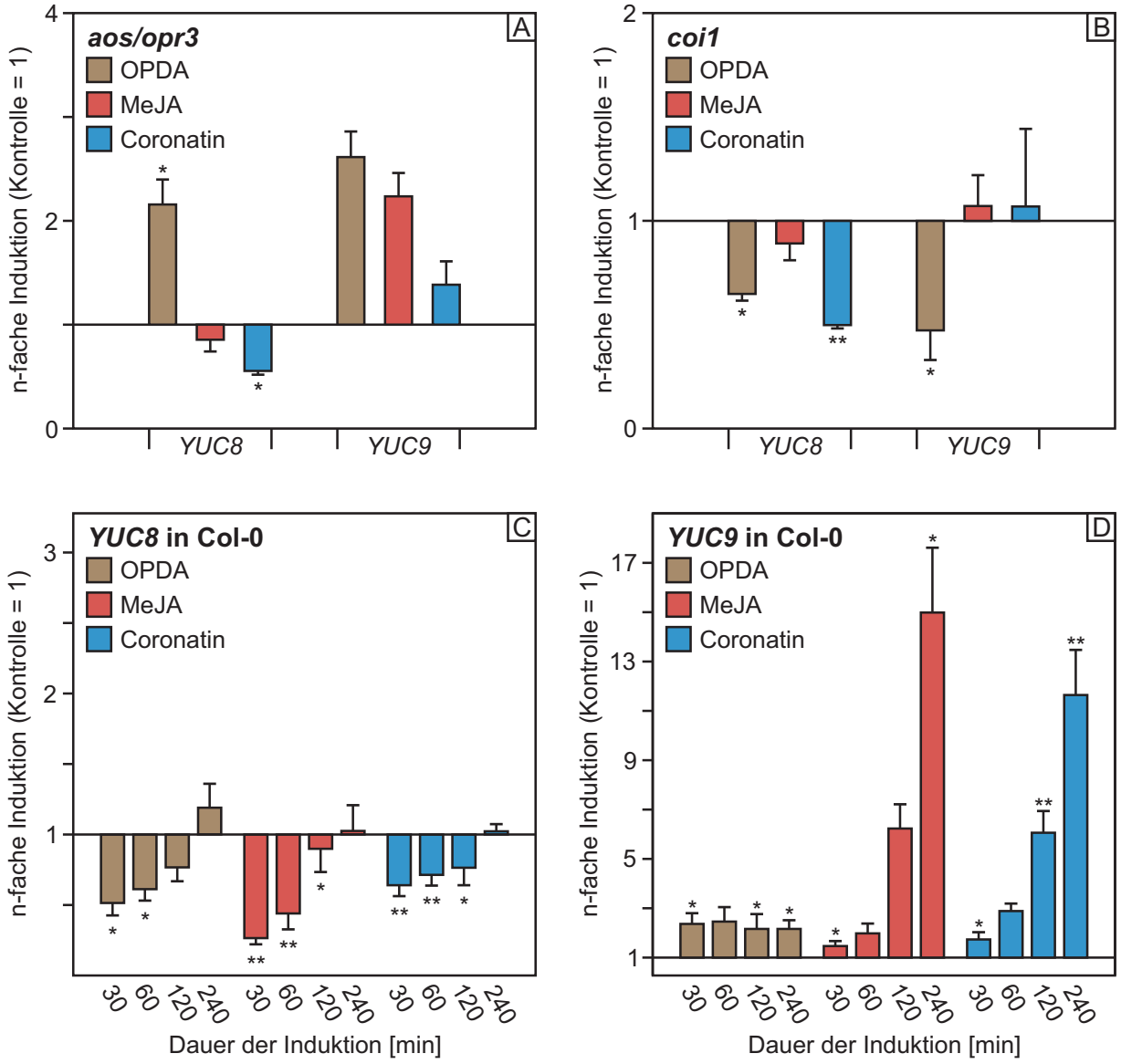


Abb. 3.5: Quantitative Transkriptanalysen von *YUC8* und *YUC9* in *aos/opr3*, *coi1* und Col-0 nach Behandlung mit Octadecanoiden und Coronatin
Die Quantifizierung der *YUC8*- und *YUC9*-Transkripte in *aos/opr3* (A) und *coi1* (B) erfolgten nach zwei Stunden Induktion mit OPDA, MeJA bzw. Coronatin (2.5.13, 2.6.11). Die Transkriptmengenbestimmung von *YUC8* (C) und *YUC9* (D) in Wildtyppflanzen (C und D) erfolgte nach 30, 60, 120 und 240 min Induktion mit OPDA, MeJA bzw. Coronatin. Für die Studien wurden sieben Tage alte Keimlinge verwendet. Zur Kontrolle dienten gleichaltrige *aos/opr3*-, *coi1*- bzw. Col-0-Keimlinge, welche mit dem entsprechenden Lösungsmittel ohne Zusätze behandelt wurden. Die Werte sind auf die Kontrolle (=1) normiert und geben die Veränderung als Vielfache der Kontrolle an. [Fehlerbalken $\pm SEM$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$]

che Repression durch Coronatin. *YUC9* wurde durch OPDA, zusätzlich durch MeJA und schwächer nach Coronatin-Gabe induziert. Bei der *coi1*-Nullmutante (Abb. 3.5 B) zeigte sich hingegen keine signifikante Transkriptsteigerung, jedoch eine Erniedrigung der *YUC8*-Transkriptmenge durch OPDA und Coronatin sowie des *YUC9*-Transkripts durch OPDA.
Zur Analyse der Induzierbarkeit von *YUC8* und *YUC9* in Wildtyppflanzen wurden quantitative Transkriptbestimmungen zu verschiedenen Zeitpunkten (30, 60, 120 und 240 Minuten) nach Beginn der Induktion mit OPDA, MeJA bzw. Coronatin durchgeführt (Abb. 3.5 C und D). Coronatin ist ein Strukturanalogon der physiologisch aktiven Form von MeJA und führt ebenfalls zur pflanzenspezifischen Wundanwort. Zu Beginn wurde *YUC8* (Abb. 3.5 C) durch die Substanzen reprimiert und stieg nach vier Stunden wieder auf den Wert der Kontrolle an. Bei OPDA zeigte sich nach dem Zeitraum eine leichte Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle. Die Transkriptmengen von *YUC9* (Abb. 3.5 D) sind durch die OPDA-Gabe konstant auf etwa das Doppelte der Kontrollbedingungen angestiegen. MeJA und Coronatin übten eine starke zeitabhängige Induktion auf die Transkription von *YUC9* aus. Über die Zeit stiegen die Transkripte kontinuierlich auf über das 12- (Coronatin) bzw. 15-fache an (MeJA).

3.2.3 Analysen zum Einfluss weiterer Faktoren auf die Transkription von *YUC8* und *YUC9*

Zusätzlich zu den quantitativen Transkript-Analysen erfolgten semiquantitative Studien, um Anhaltspunkte bezüglich anderer Induktionsbedingungen von *YUC8* und *YUC9* zu erhalten. Hierfür wurden eine Reihe von biotischen und abiotischen Faktoren untersucht. Unter anderem wurden die Lichtverhältnisse verändert (Neutralschatten, Dunkelheit, dunkelrotes Licht) und die Temperatur variiert (4 °C, 38 °C), da anhand von Gen-Chip-Analysen eine Licht- bzw. Temperaturabhängigkeit von *YUC8* beobachtet wurde [253]. Die Hochregulationen ist jedoch zeitlich versetzt. Es ist daher denkbar, dass der in den RT-PCR-Analysen gewählte Induktionszeitraum von 2 h zu kurz für eine Induktion von *YUC8* durch veränderte Licht- und Temperaturbedingungen war. Weiterhin wurden Entwicklungsbedingungen gewählt (etioliert, etioliert + 2 h Licht) und osmotische Veränderungen bzw. Membranstress simuliert (150 mM NaCl, 400 mM Mannitol, 6 % (w/v) Glucose). Die für *YUC2* beschriebene Induktion durch Glucose [248] konnte für *YUC8* und *YUC9* jedoch ausgeschlossen werden. Zudem erfolgte die Analyse von möglichem Substratüberschuss (0,5 mM Trp, 0,25 mM 5-MT) und die Relevanz anderer Phytohor-

mone wie Ethylen (10 µM ACC, 1 mM Ethephon) und 100 µM Abscisinsäure auf die Transkription. Als einheitliche Inkubationsdauer wurden 2 h gewählt. Bedingungen, welche zu einer Steigerung der Transkripte führten, sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Tryptophan (Trp) ist das Ausgangssubstrat der Auxinbiosynthese (Abb. 1.1). Sowohl mit Trp als auch mit dem phytotoxischen Trp-Analogon 5-Methyltryptophan (5-MT) sollte der Einfluss einer substratabhängigen Induktion untersucht werden. Ethephon (2-Chlorethylphosphonsäure) setzt nach Aufnahme in Pflanzen das gasförmige Phytohormon Ethylen frei, womit ein möglicher Ethyleneffekt auf die Genexpression von *YUC8* und *YUC9* analysiert wurde. Mit Abscisinsäure sollte der Einfluss eines weiteren Phytohormons auf die Genregulation überprüft werden. Es zeigte sich für *YUC8* und *YUC9* ein leichter Einfluss durch Tryptophan. *YUC9* wurde sehr stark durch Coronatin induziert und ebenfalls schwach durch Trp. Zusätzlich wies 5-MT einen schwachen und Ethephon einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Induktion der *YUC9*-Genexpression auf. Für die anderen untersuchten Bedingungen konnten in dem Zeitraum keine signifikanten Änderungen festgestellt werden (ohne Abbildung).

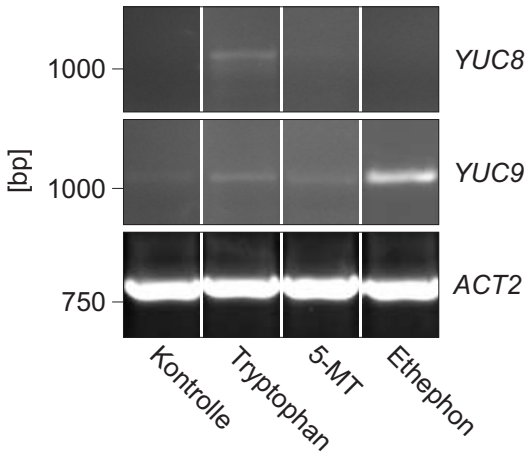


Abb. 3.6: Einfluss verschiedener exogener Faktoren auf die *YUC8*- und *YUC9*-Genexpression
Sieben Tage alte Keimlinge von *A. thaliana* Col-0 wurden nach steriler Anzucht (2.5.8) mit verschiedenen biotischen und abiotischen Faktoren behandelt (2.5.13). Nach Aufarbeitung (2.6.6) wurden semiquantitative RT-PCR-Studien mit *ACT2* als Referenz durchgeführt (2.6.10). In der Abbildung sind die Faktoren dargestellt (0,5 mM Trp, 0,25 mM 5-MT, 1 mM Ethephon), bei denen nach 2 h eine Transkriptsteigerung bei *YUC8* oder *YUC9* beobachtet wurde. Als Kontrolle wurden die Keimlinge mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt.

3.3 Transiente Überexpression in *Nicotiana benthamiana*

Zur Untersuchung, ob eine *YUC8*- bzw. *YUC9*-Überexpression zu physiologischen Veränderungen *in planta* führt, wurden entsprechende Überexpressionskonstrukte zur transienten Expression in *N. benthamiana* eingebracht. Gleichzeitig dienten die Studien zur Überprüfung der erstellten Überexpressionskonstrukte, welche auch zur Herstellung von stabilen *Arabidopsis*-Überexpressionslinien verwendet wurden (3.4).

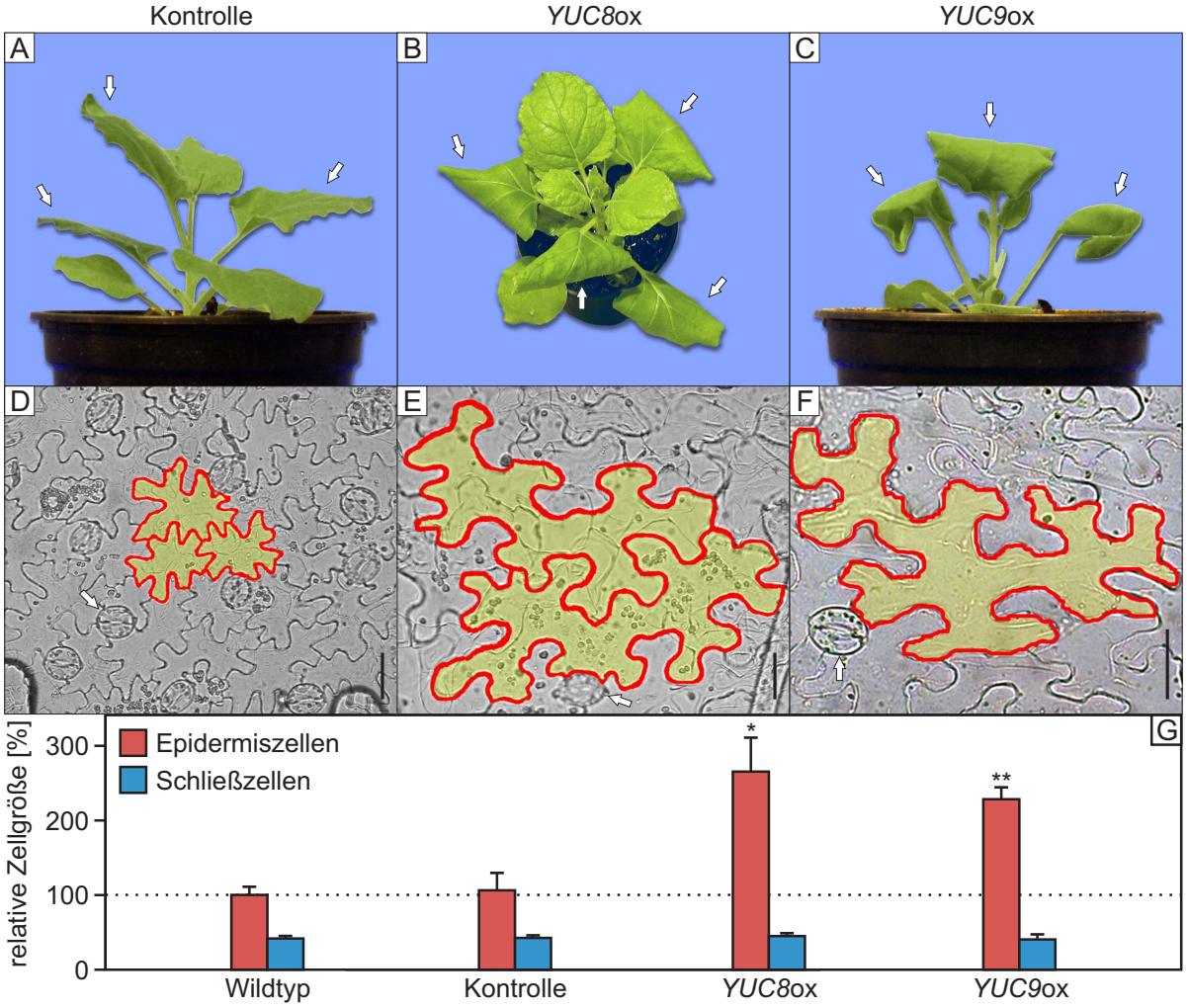


Abb. 3.7: Transiente *YUC8*- und *YUC9*-Überexpression in *Nicotiana benthamiana*
N.-benthamiana-Pflanzen wurden mit Überexpressionskonstrukten transformiert (2.5.9) und die phänotypische Veränderung nach 24 h dokumentiert (2.13). Weiße Pfeile markieren die infiltrierten Blätter (A – C) bzw. die Schließzellen (D – F). Exemplarisch dargestellt sind die Plasmidkontrolle pSP-DEST1.1 (A und D) *YUC8*ox (B und E) sowie *YUC9*ox (C und F). G zeigt die relativen Zellgrößen von Epidermis- und Schließzellen im Vergleich. [D – F: Maßstab 50 µm; G: Fehlerbalken $\pm SD$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, $n = 30$]

Es wurden *N.-benthamiana*-Pflanzen angezogen (2.5.8) und mit den Plasmiden pD1-35S-YUC8-myc (*YUC8*ox), pD1-35S-YUC9-myc (*YUC9*ox), pN-TAP-YUC8 (*YUC8*tap), pN-TAP-YUC9 (*YUC9*tap) sowie pSP-DEST1.1 und pN-TAP als Kontrolle (2.3.2) *A.-tumefaciens*-vermittelt transformiert (2.5.9). Für die transiente Transformation wurden die Unterseiten von Tabakblättern mit Hilfe einer Spritze mit der entsprechenden *A.-tumefaciens*-Suspension infiltriert und die Tabakpflanzen anschließend unter Langtagbedingungen inkubiert. Das Aussehen der Pflanzen wurde in regelmäßigen Abständen dokumentiert (2.13). Die Abbildungen 3.7 A – C zeigen exemplarisch die Tabakpflanzen 24 Stunden nach Infiltration mit *YUC8*ox und *YUC9*ox sowie dem entsprechenden Leervektor als Kontrolle. Die transiente Transformation mit dem Kontrollkonstrukt hatte keinen Einfluss auf den Blattphänotyp (Abb. 3.7 A), während die Überexpression von *YUC8* und *YUC9* (Abb. 3.7 B und C) deutliche Blattkrümmungen verursachte. Ähnliche Blattkrümmungen waren bei den mit pN-TAP-YUC8 und pN-TAP-YUC9 infiltrierten Konstrukten erst nach etwa 48 Stunden sichtbar.
Die Analyse der Epidermis (2.5.10) zeigte eine eindeutige Induktion des Zellstreckungswachstums, welches auf die Epidermiszellen beschränkt war (Abb. 3.7 D – F). Für eine statistische Auswertung wurden die Zellgrößen der Epidermis- und Schließzellen vermessen (2.15). Die Schließzellen wiesen keine Veränderungen hinsichtlich ihrer Größe auf. Hingegen zeigten die Epidermiszellen von *YUC8*ox- und *YUC9*ox-Tabakblättern eine Steigerung auf bis zu 250 % der Zellgröße relativ zu den Wildtyp- bzw. Kontrollpflanzen (Abb. 3.7 G).
Neben den phänotypischen Analysen sollten die Experimente auch der Gewinnung von überexprimierten Fusionsproteinen *in planta* gelten. Um die Ausbeute zusätzlich zu erhöhen, erfolgte eine Doppeltransformation mit pBin61-p19 zwecks Co-Expression des p19-Proteins, welches zur Unterdrückung von „gene-silencing"-Mechanismen führt [422]. Es wurden alle sechs Stunden Blattproben für Proteinaufarbeitungen und zur Analyse der Genexpression auf Transkriptebene geerntet. Nach Aufarbeitung des Gesamtproteinextrakts mit Proteaseinhibitoren (2.7.3) wurde dieser über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immundetektion auf das Vorhandensein von Fusionsproteinen überprüft (2.8.2, 2.8.4). Zudem erfolgte die Aufarbeitung der Gesamt-RNA und die cDNA-Synthese mit anschließender RT-PCR (2.6.6, 2.6.8, 2.6.10). Abbildung 3.8 zeigt exemplarisch die Ergebnisse von *YUC8*ox-Tabakblättern. Die spezifischen Oligonukleotide (2.3.1) amplifizierten die volle Länge von *YUC8* inklusive myc-Anhang. Die erwartete Größe für das Amplifikat beträgt 1332 bp. Es war zu erkennen, dass der Transkriptgehalt von *YUC8*:*myc* sechs Stunden nach Infiltration anstieg und nach einem Höhepunkt

zwischen ein und zwei Tagen wieder absank. Trotz der der Co-Expression des p19-Proteins, der hohen *YUC8*:*myc*-Transkriptmenge und der beobachteten Phänotypen konnten weder entsprechende Proteine für *YUC8*ox- noch für *YUC9*ox- sowie *YUC8*tap- und *YUC9*tap-exprimierende *N.-benthamiana*-Blätter nachgewiesen werden.

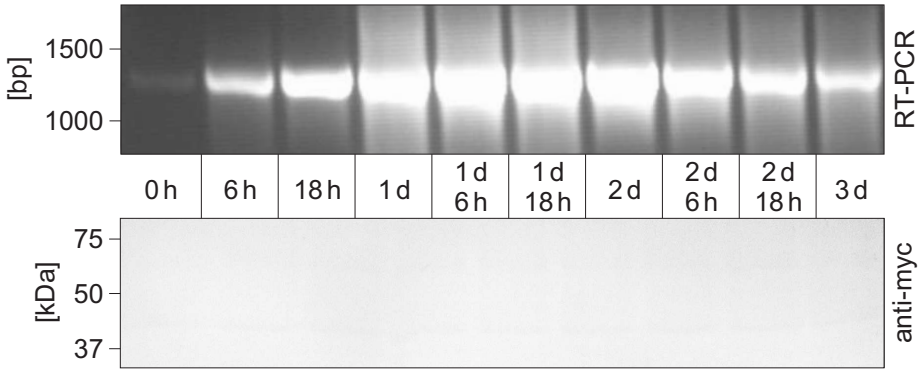


Abb. 3.8: Transkript- und Proteingehalte in *YUC8*ox-infiltrierten *N. benthamiana*-Blättern
Blätter von *N. benthamiana* wurden mit pD1-35S-YUC8-myc und pBin61-p19 infiltriert (2.3.2, 2.5.9). Nach Infiltration erfolgte in definierten Zeitabständen die Probennahme für eine semiquantitative RT-PCR-Analyse (2.6.10) und zum Nachweis von Fusionsproteinen die Immundetektion mit entsprechenden Antikörpern (2.8.4).

3.4 Genotypische Untersuchung sowie Herstellung und Selektion von *YUC8*- und *YUC9*-Funktionsmutanten

Neben Transkript- und Protein-Analysen sowie transienten Expressionsstudien gibt insbesondere die Charakterisierung transgener Pflanzen Aufschluss über die physiologische Funktion von Genen und deren Genprodukten. Dabei hilft die vergleichende Untersuchung von Mutanten, denen die zu analysierenden Gene fehlen oder die diese Gene überexprimieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden T-DNA-Nullmutanten sowie drei verschiedene Überexpressionssysteme verwendet, um eine tiefgreifende Analyse der Funktion von *YUC8* und *YUC9* zu ermöglichen.
Zur Untersuchung der physiologischen Relevanz von *YUC8* und *YUC9* wurde bereits in Vorarbeiten mit der genotypischen Analyse entsprechender Nullmutanten begonnen [161] und in dieser Arbeit fortgeführt (2.6.13). In Nullmutanten sind die entsprechenden Gene durch Transposon-, T-DNA-Insertionen oder Mutationen inaktiviert. Dadurch konnten bereits homozygote Linien identifiziert werden, welche das entsprechende Genprodukt nicht synthetisieren können. Phänotypische Untersuchungen wurden mit diesen Linien jedoch nicht mehr durchgeführt, da im Verlaufe dieser Arbeit funktio-

nelle Nullmutanten von *YUC8* und *YUC9* in einer Arbeit zur Schattenvermeidungsreaktion publiziert wurden [389]. Für die weiteren Analysen in dieser Arbeit wurden diese *yuc8*- und *yuc9*-Nullmutanten verwendet. Um eventuell redundante Effekte von *YUC8* und *YUC9* zu analysieren, erfolgte zusätzlich die Untersuchung einer *yuc8/yuc9*-Doppelmutante, welche von Y. Zhao (Universität von Kalifornien, San Diego) bezogen wurde.
Im Gegensatz zu Nullmutanten handelt es sich bei Überexpressionslinien um genetisch modifizierte Pflanzen, welche das entsprechende Gen konstitutiv oder kontrolliert in hohem Maße ablesen und dadurch zu phänotypischen Veränderungen führen können. Für eine Erstellung konstitutiver Überexpressionslinien wurden *YUC8* und *YUC9* zur Immundetektion mit dem myc-Epitop fusioniert und unter Kontrolle eines *35S*-Promotors exprimiert.
Die Konstrukte wurden hierfür in einem geeigneten Vektorsystem innerhalb der LB- und RB-T-DNA-Rekombinationsstellen fusioniert (Abb. 6.3). Der virale *35S*-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus führt dabei zu einer starken und konstitutiv Expression *in planta*. Anschließend erfolgte mit Hilfe von *A. tumefaciens* die stabile und ungerichtete Integration der T-DNA-Region von pD1-35S-YUC8-myc bzw. pD1-35S-YUC9-myc (2.4.2) in das Genom von *A. thaliana* (2.5.11). Das daraus gewonnene Saatgut wurde erneut ausgesät und mit dem Herbizid BASTA® auf erfolgreich transformierte Pflanzen selektioniert (2.5.8). Um mögliche Lokalisationseffekte der Insertionen in den späteren Versuchsreihen auszuschließen und eindeutig homozygote Linien zu erhalten, wurden für *YUC8* und *YUC9* je sechs unabhängige Linien in drei weiteren Generationen selektioniert. Stabile Überexpressionspflanzen sind entsprechend mit *YUC8*ox und *YUC9*ox gekennzeichnet (2.4.2).
Die konstitutive Überexpression unter Verwendung des pN-TAP-Systems erfolgt durch zwei serielle *35S*-Promotoren. Das System erlaubt durch den TAP-Anhang eine Aufreinigung der homolog exprimierten Proteine und ganzer Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen mittels Affinitätschromatographie und Protease-vermittelter Elution [325]. Die Klonierungsstrategie ist im Anhang in der Abbildung 6.4 dargestellt. Die T-DNA der Plasmide pN-TAP-YUC8 bzw. pN-TAP-YUC9 (2.4.2) wurde stabil in das Genom von *A. thaliana* eingebracht (2.5.11), das gewonnene Saatgut anschließend erneut ausgesät und auf Gentamycin selektioniert (2.5.8). Homozygote Linien wurden durch Selektionierung über drei Generationen erhalten. Für *YUC8* und *YUC9* existieren je vier unabhängige Linien, welche nachfolgend als *YUC8*tap bzw. *YUC9*tap bezeichnet werden (2.4.2).

Eine konstitutive Überexpression von bestimmten Genen kann unter Umständen schädigend auf die Pflanze wirken bzw. letal sein. Um diesem Effekt entgegenzuwirken und weitere Analysen zu ermöglichen, wurden Konstrukte erstellt, die eine spezifische Induktion der Genexpression durch β-Estradiol ermöglichen. Die für *YUC8* und *YUC9* durchgeführte Klonierungsstrategie ist im Anhang in Abbildung 6.5 erläutert. Nach stabiler Transformation der T-DNA von pER8G-YUC8-myc (XVE::*YUC8*:*myc*, *hpt*) bzw. pER8G-YUC9-myc (XVE::*YUC9*:*myc*, *hpt*) mittels „floral dip“ in das Genom von *A. thaliana* (2.5.11) erfolgte eine Selektion der Linien auf Hygromycin (2.5.8). Auch in diesem Fall wurden zur Erhaltung homozygoter Linien jeweils vier unabhängige Linien über drei Generation selektioniert. Die nachfolgende Bezeichnung der transgenen Linien ist *YUC8*ind bzw. *YUC9*ind (2.4.2).
Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Überexpressionslinien wurden durch ungerichtete *A.-tumefaciens*-vermittelte Transformationen erstellt (2.5.11). Dabei inseriert die T-DNA (4,5 kbp) des Bakteriums willkürlich in das pflanzliche Genom [32, 452], wodurch die Anzahl und Loci der Insertionen variieren. Zur Bestimmung der T-DNA-Insertionshäufigkeit wurden daher radioaktive und nichtradioaktive „Southern-Transfer“-Studien durchgeführt (2.6.13). Die Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch die Analysen zur Insertionshäufigkeit von zwei *YUC8*ox-Linien.

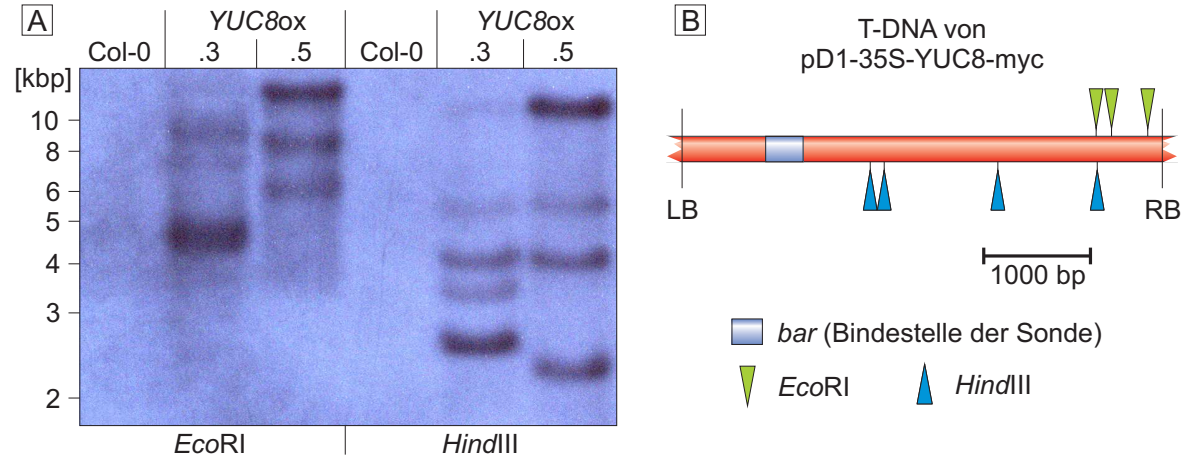


Abb. 3.9: Analyse der T-DNA-Insertionshäufigkeit von Überexpressionslinien
Jeweils 10 µg DNA von *A. thaliana* Col-0 als Kontrolle, YUC8ox.3 und YUC8ox.5 wurden aufgearbeitet, mit *Eco*RI bzw. *Hind*III enzymatisch verdaut und mit Hilfe der bar-Sonde nichtradioaktiv detektiert (2.6.13). A zeigt die Signale nach Detektion mittels Röntgenfilm. Das Schema zu Berechnung der erwarteten Mindestgröße der Signale (*Eco*RI >4669 bp, *Hind*III >1854 bp) ist in B dargestellt. LB und RB markieren hierbei die Grenzen der bekannten T-DNA.

Die T-DNA-spezifischen Sonden bildeten keine Kreuzreaktionen mit der Wildtyp-DNA von *A. thaliana* Col-0 (Abb. 3.9 A). In den Linien *YUC8*ox.3 und *YUC8*ox.5 war zu erkennen, dass in beiden Mutanten jeweils vier T-DNA-Insertionen enthalten waren. In den anderen untersuchten Überexpressionslinien waren ebenfalls Mehrfach-Insertionen vorhanden. Um Mengen- und Lokalisationseffekte bei den erhaltenen Linien weitgehend auszuschließen, wurden für die nachfolgenden Analysen mindestens vier unabhängige Überexpressionslinien verwendet. Sofern alle Linien denselben Überexpressionseffekt aufzeigten, konnte die beobachtete Eigenschaft mit hoher Wahrscheinlichkeit spezifisch auf die Überproduktion von *YUC8* bzw. *YUC9* zurückgeführt werden.

3.5 Phänotypische Charakterisierung von *YUC8*- und *YUC9*-Nullmutanten und -Überexpressionslinien

Die transiente Überexpression von *YUC8* bzw. *YUC9* in *N.-benthamiana*-Blättern zeigte bereits einen deutlichen Einfluss auf die Zellstreckung (3.3). Mit Hilfe der erstellten stabilen Überexpressionslinien *YUC8*ox, *YUC9*ox, *YUC8*tap, *YUC9*tap, *YUC8*ind und *YUC9*ind (2.4.2) war eine weitreichende Charakterisierung der pflanzlichen Veränderungen durch Überproduktion von *YUC8* bzw. *YUC9* in *A. thaliana* möglich. Zudem wurden, sofern möglich, Vergleiche mit der *yuc8/yuc9*-Doppelmutante gezogen, um den phänotypischen Einfluss bei Verlust der Gene beschreiben zu können.
Morphologische Veränderungen ließen sich bei den Überexpressionslinien schon im Keimlingsstadium beobachten (Abb. 3.10 A – E). Verglichen mit dem Wildtyp Col-0 (A und E) wies die *yuc8/yuc9*-Nullmutante (D und H) keine sichtbaren Unterschiede auf. Hingegen zeigten *YUC8*ox (B und F) und *YUC9*ox (C und G) im Vergleich zu Col-0 verlängerte Hypokotyle und Petiolen sowie epinastische Kotyledonen. Bei den älteren Überexpressionspflanzen (Abb. 3.10 F und G) fielen die insgesamt kleineren Rosetten sowie die lanzettförmigen, schmalen und verhärteten Blätter auf. *YUC8*tap und *YUC9*tap zeigten entsprechende Phänotypen, jedoch in schwächerer Ausprägung.
Neben den veränderten Blattformen war insbesondere die veränderte Entwicklung der Blütenorgane der Überexpressionslinien auffällig. Abbildung 3.11 zeigt exemplarisch die phänotypischen Ausprägungen von *YUC8*ox-Linien. Während der Selbstbestäubungsmechanismus in Wildtyppflanzen kurz vor Öffnen der Blüte abgeschlossen ist (Abb. 3.11 A und B), lag bei den Mutanten eine Form von mechanischer Sterilität vor. Die Staubblätter waren im Wachstum eingeschränkt, während das Fruchtblatt zu schnell wuchs, so dass der Pollen die Narbe nicht oder nur unvollständig erreichte (Abb. 3.11

C und D). In weiteren Fällen waren die Blüten männlich steril, da die Entwicklung der Staubblätter massiv beeinflusst war (Abb. 3.11 E und F). Die ausgeprägtesten Blütenphänotypen traten zum Zeitpunkt der fast abgeschlossenen Entwicklung der primären Infloreszenz auf. Zu diesem Zeitpunkt hat die Pflanze ihr Höhenwachstum beendet. Die Reproduktionsorgane im Bereich der terminalen Blüte wiesen ausgeprägte, morphologische Veränderungen, wie das komplette Fehlen von Kelch-, Kron- und Staubblättern, auf (Abb. 3.11 G). Zum Teil entwickelten sich doppelte, offene Fruchtblätter (Abb. 3.11 H) oder es wuchsen mehrfach neue Fruchtblätter aus bestehenden Narben (Abb. 3.11 I). Je stärker die Fehlentwicklungen ausgeprägt waren, desto verhärteter waren die betroffenen Organe selbst und der Bereich darum. Ähnliche Effekte waren ebenfalls bei *YUC9*ox sowie bei *YUC8*tap und *YUC9*tap in schwächerer Form präsent, wobei die stärksten Blütendeformationen bei den *YUC9*-Überexpressionslinien bereits etwa 5 cm vor Erreichen der terminalen Blüte auftraten.

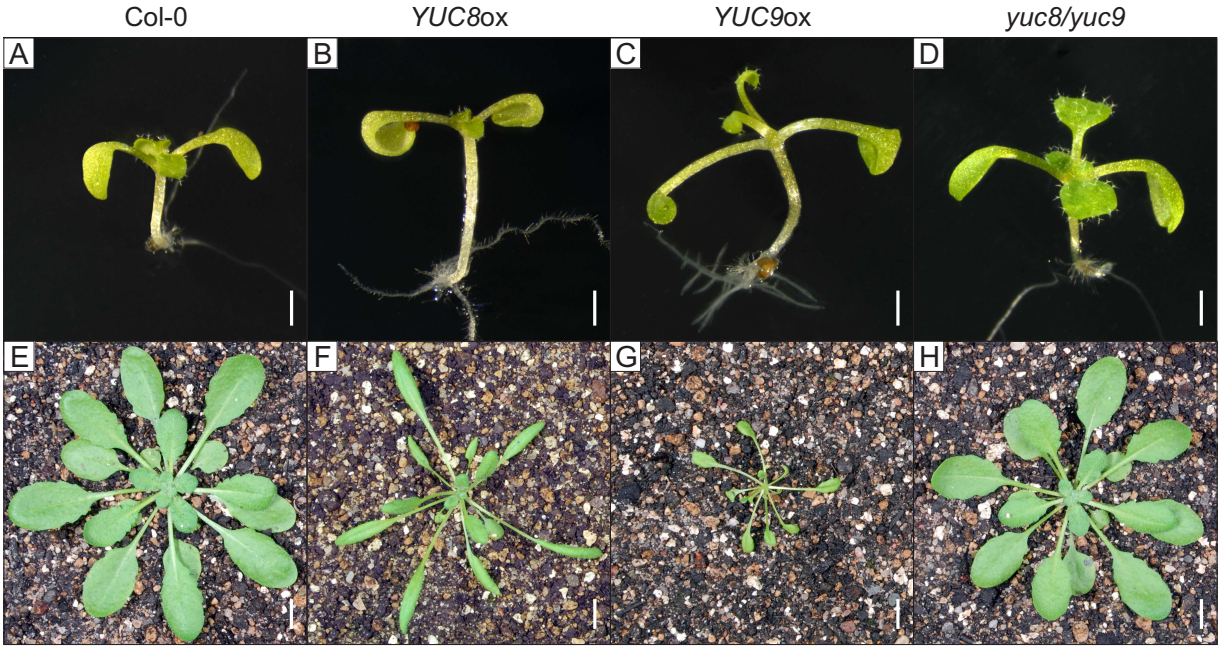


Abb. 3.10: Phänotyp von Keimlingen und fünf Wochen alten *YUC8*ox-, *YUC9*ox- und *yuc8*/*yuc9*-Linien
Eine Woche alte Keimlinge (A – D) und fünf Wochen alte Pflanzen (E – H) im Vergleich. Dargestellt sind Col-0 (A und E), *YUC8*ox (B und F), *YUC9*ox (C und G) und *yuc8/yuc9* (D und H). Die Anzucht der Keimlinge erfolgte steril unter Kurztagbedingungen. Nach einer Woche erfolgte die Fotodokumentation bzw. nach zwei Wochen wurden die Keimlinge auf Erde pikiert und nach drei weiteren Wochen unter Kurztagbedingungen der Phänotyp dokumentiert (2.5.8, 2.13). [Maßstab: A – D 1 mm, E – H 5 mm]

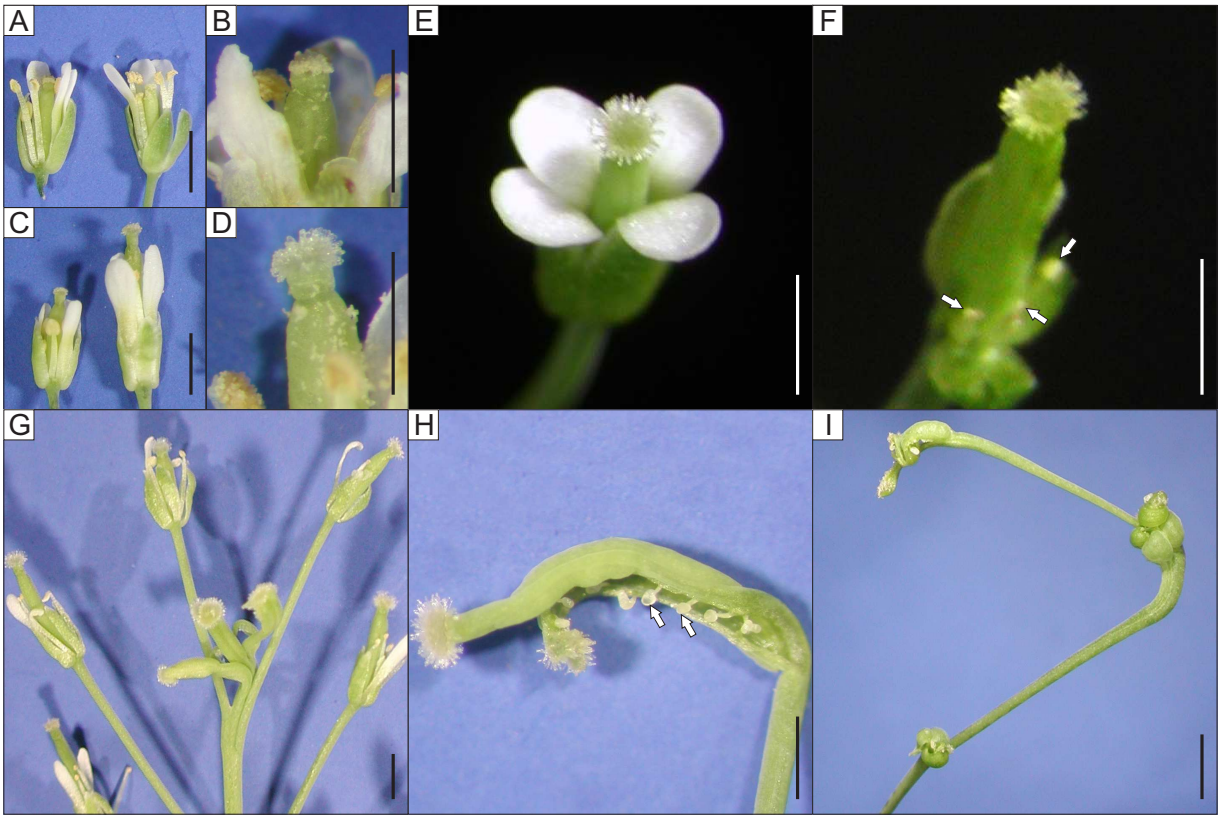


Abb. 3.11: Veränderte Blütenmorphologie der Überexpressionslinien
Zu sehen sind die Blütenorgane von Col-0 (A und B) und exemplarisch von *YUC8*ox (C – I). Die normale Blütenentwicklung (A) ermöglicht die Selbstbestäubung des Wildtyps (B) im Vergleich zu den veränderten Wachstumsverhältnissen von Staub- und Fruchtblättern bei *YUC8*ox (C) und die daraus resultierende mechanische Sterilität (D). Weitere Merkmale sind fehlentwickelte Staubblätter (E und F, Pfeile markieren die Staubblätter), abnormale Entwicklungen im Bereich der terminalen Blüte (G), offene Fruchtblätter (H, Pfeile markieren die unbefruchteten Eizellen) und unkontrolliertes Fruchtblattwachstum (I). [Maßstab 1 mm]

In Abbildung 3.12 sind die phänotypischen Ausprägungen der Schoten und Samen zusammengefasst. Resultierend aus der fehlenden Selbstbestäubung, zeigten die Pflanzen zwar ausgewachsene, jedoch parthenokarpe Schoten ohne keimfähiges Saatgut (Abb. 3.12 C). Trotz der ausgeprägten mechanischen Sterilität konnte Saatgut durch Umbeugen der Triebe erhalten werden, so dass der Pollen auf die Narbe fiel (Abb. 3.12 D und E). Bei manuell bestäubten Blüten erschienen die Schoten der Überexpressionslinien nach außen ausgebeult (Abb. 3.12 F und G). Aufgrund der vergrößerten Samen (Abb. 3.12 J) konnten die Schotenhüllen dem Druck nicht standhalten und platzten auf (Abb. 3.12 H und I).

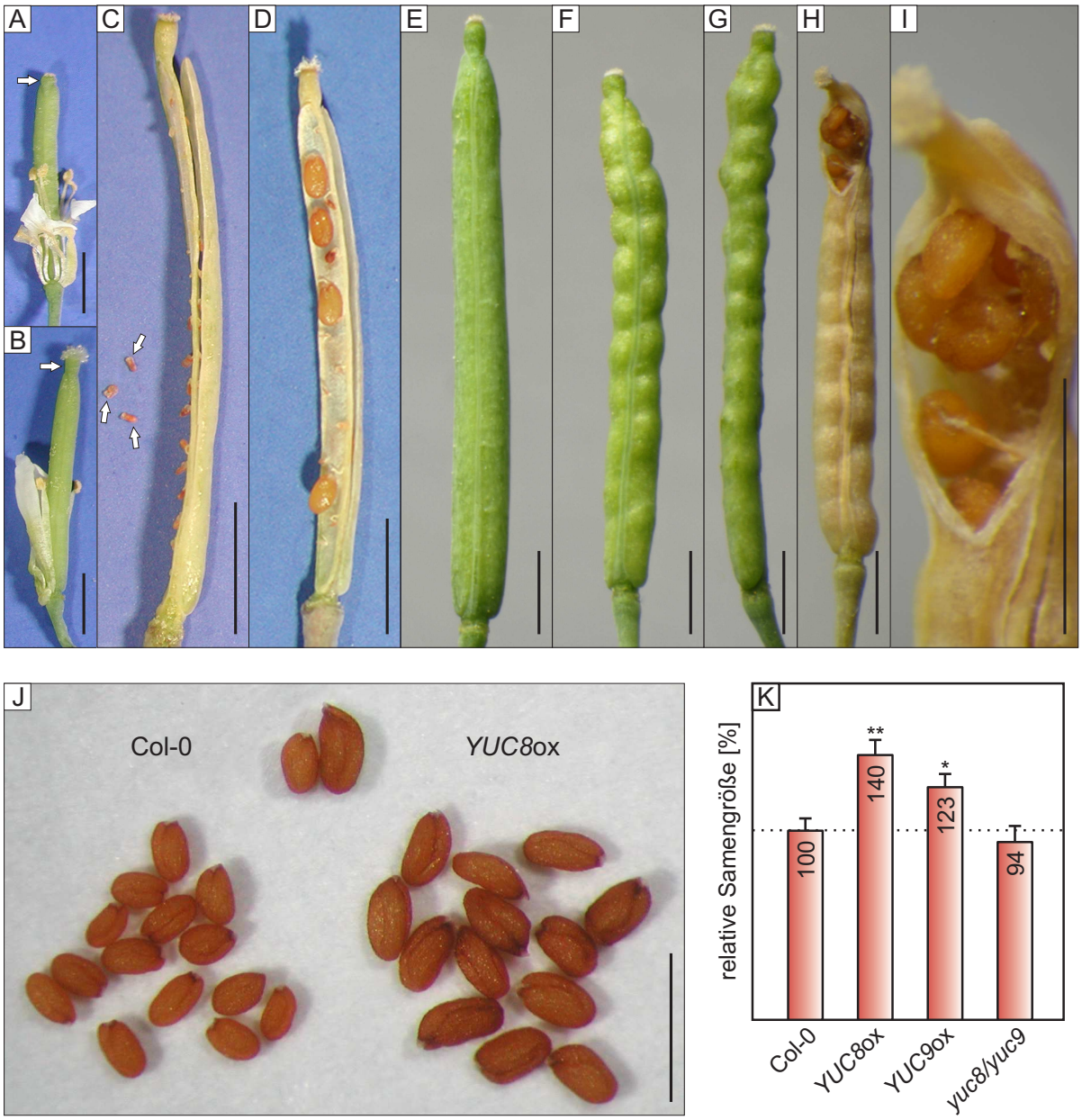
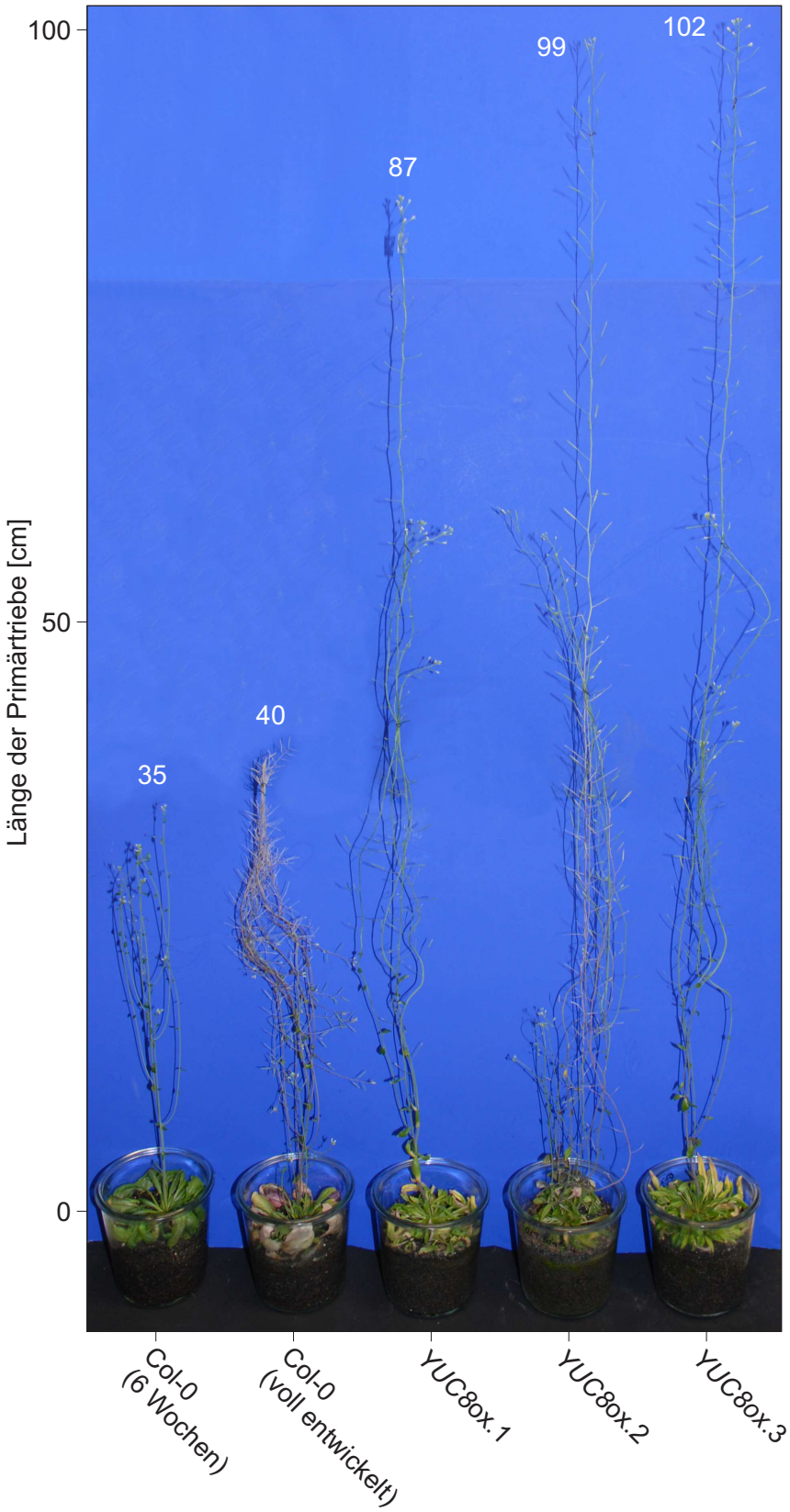


Abb. 3.12: Schotenhabitus und vergrößertes Saatgut von *YUC8*ox und *YUC9*ox
A zeigt eine sich entwickelnde Schote von Col-0 zwei Tage nach Selbstbestäubung, während in B eine der Entwicklung entsprechende unbestäubte Blüte von *YUC8*ox abgebildet ist. Exemplarisch für die Überexpressionslinien sind Schoten von *YUC8*ox (C – I) dargestellt. Bei den Überexpressionsmutanten waren der verlängerte Habitus des Stylus (Pfeile in A und B) sowie die unbestäubten Schoten ohne fertiles Saatgut (C, Pfeile markieren die nicht befruchteten Eizellen) auffällig. Eine teilweise Bestäubung führte zu unvollständig gefüllten (D und E) und die komplette Bestäubung zu ausgebeulten Schoten (F und G), wodurch teilweise die Hülle aufplatzte (H und I). Zurückzuführen ist dieser Effekt auf das vergrößerte Saatgut (J). K zeigt die relative Samengröße von *YUC8*ox, *YUC9*ox und *yuc8/yuc9* im Verhältnis zu Col-0. [Maßstab: A – H 1 mm; K: Fehlerbalken $\pm SEM$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, $n = 50$]

Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurden jeweils 50 Samen fotografiert und mittels ImageJ die längste Gerade in einem Samenkorn bestimmt (2.13). Im Schnitt ist das Saatgut von *YUC8*ox 40 % und das von *YUC9*ox 23 % größer als das von Wildtyppflanzen (Abb. 3.12 K). Die Samen der *yuc8/yuc9*-Nullmutante waren unsignifikant kleiner als das Saatgut von Col-0. Auch die Linien von *YUC8*tap sowie *YUC9*tap wiesen vergrößerte Samen auf.
Charakteristisch für die Überexpressionsmutanten war der ausgeprägte Wuchs der Triebe (Abb. 3.13). Die Primärtriebe der *YUC8*ox-Linien erreichten eine Länge zwischen 80 und 100 cm. Im Vergleich zu Wildtyppflanzen mit 30 – 40 cm Wuchshöhe waren sie damit mehr als doppelt so lang. *YUC9*ox-Linien erreichten Trieblängen von bis zu 117 cm, während Linien von *YUC8*tap und *YUC9*tap eine Länge von 60 – 80 cm aufwiesen. Die Stängel der Überexpressionslinien waren insbesondere im unteren Bereich stärker verhärtet als beim Wildtyp. Dadurch wuchsen sie bis zu einer Höhe von etwa 50 cm stabil. Bei weiterem Wachstum waren Stützmechanismen erforderlich, damit die Stängel nicht umknickten. Ein verändertes Wachstum der Triebe konnte bei *yuc8*-, *yuc9*- sowie *yuc8/yuc9*-Nullmutanten nicht beobachtet werden.
Bei näherer Betrachtung der Triebe zeigten sich im Vergleich zum Wildtyp starke morphologische Veränderungen durch Überexpression von *YUC8* und *YUC9* (Abb. 3.14). In oberen Bereichen des Stängels erfolgte gehäuft eine Art Zick-Zack-Wachstum (Abb. 3.14 A). In unteren und mittleren Bereichen war eine Verdickung des Stängels zu beobachten. Die Abbildung 3.14 B zeigt den Übergang eines verdickten (mittlere Region) in einen normal entwickelten Stängelhabitus (obere Region). Zudem waren weitere Defekte bei der Blütenentwicklung erkennbar. Es wurden lediglich Knospen ausgebildet, welche sich nicht weiter differenzierten und schließlich seneszent wurden. Bei Pflanzen mit sehr ausgeprägtem Dickenwachstum kam es zu einem Absterben von Nebentrieben (Abb. 3.14 C). Diese abgestorbenen Nebentriebe zeigten eine massive Gewebeverhärtung und wurden von der Spitze beginnend seneszent. Das Dickenwachstum der Triebe im Vergleich zum Wildtyp ist in Abbildung 3.14 D dargestellt. Verglichen mit Col-0 (links)

Abb. 3.13 *(auf der nächsten Seite)*:
Primärtriebe von Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp
Dargestellt sind drei unabhängige Linien von *YUC8*ox im Alter von sechs Wochen im Vergleich zu einer ebenfalls sechs Wochen alten Wildtyppflanze (Col-0) und einer voll entwickelten Wildtyppflanze im Alter von acht Wochen. Um die Triebe in der vollen Länge darzustellen, wurden sie mit einem Faden fixiert. Die angegeben Zahlen entsprechen der Länge des Primärtriebs in Zentimetern. [Maßstab 5 cm]


Länge der Primärtriebe [cm]
100
50
0
35
40
87
99
102
Col-0 (6 Wochen)
Col-0 (voll entwickelt)
YUC8ox.1
YUC8ox.2
YUC8ox.3

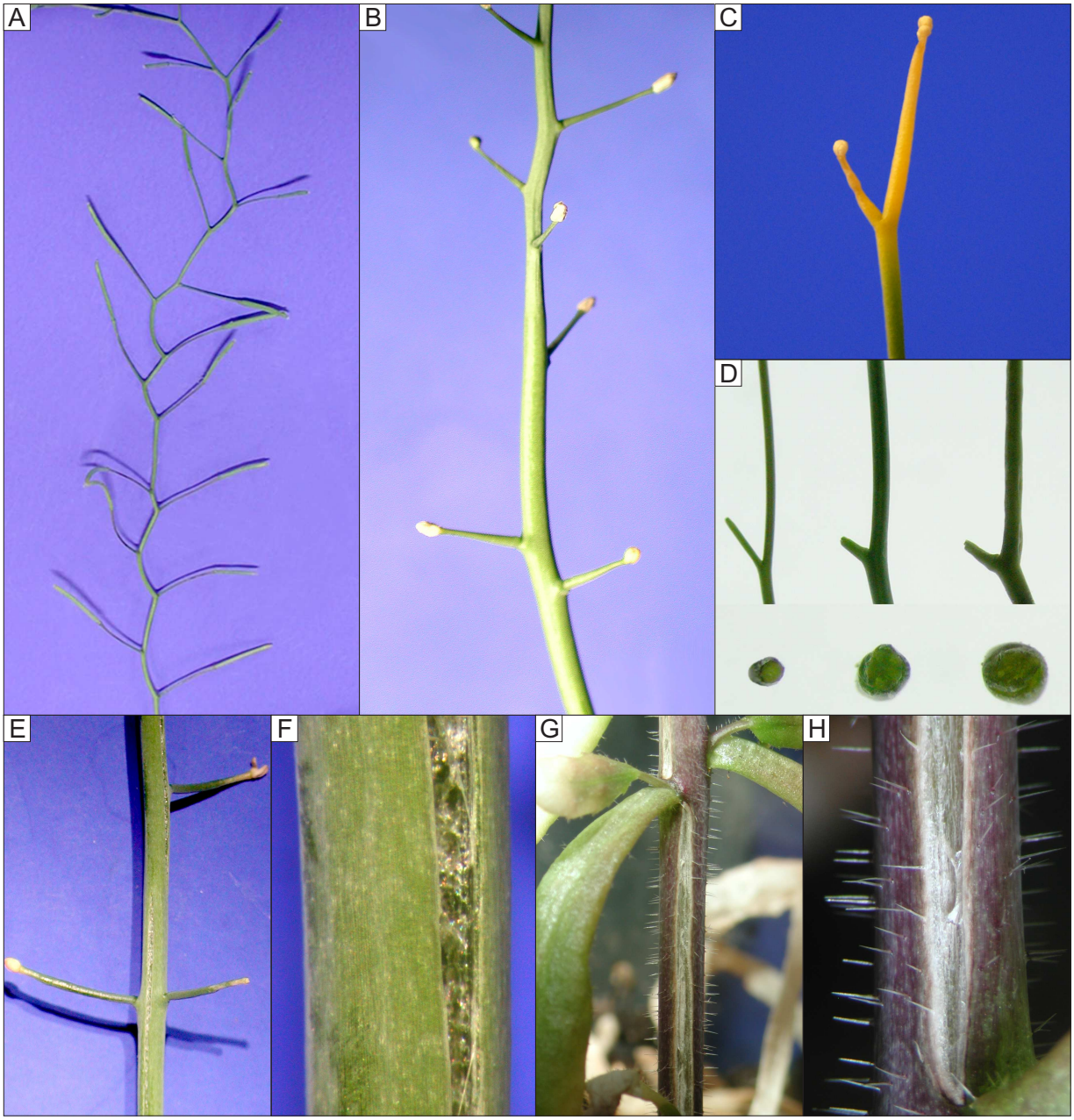


Abb. 3.14: Abnormes Dickenwachstum der Stängel von Überexpressionslinien
Die Abbildung zeigt das veränderte Dickenwachstum von Trieben exemplarisch bei sieben Wochen alten *YUC8*ox-Überexpressionslinien. Zu sehen sind das Zick-Zack-Wachstum oberer Bereiche (A), der Übergangsbereich des auftretenden Dickenwachstums (B), die eingeschränkte Blütenbildung (B), ein abgestorbener Seitentrieb (C), das unterschiedliche Dickenwachstum (D) bei Col-0 (links), *YUC8*ox (Mitte) und *YUC9*ox (rechts) sowie das dadurch ausgelöste Aufreißen der Stängel (E und F) und die holzähnliche Struktur (G und H).

zeigt der Querschnitt von *YUC8*ox (Mitte) und *YUC9*ox (rechts) einen bis zu dreimal höheren Durchmesser der unteren Triebbereiche. Teilweise war das Dickenwachstum so ausgeprägt, dass der Stängel dem nicht standhalten konnte und aufriss (Abb. 3.14 E und F). Die phänotypischen Ausprägungen zeigten in manchen Fällen eine Art Verholzung (Abb. 3.14 G und H), wobei die Stängel keine Elastizität mehr aufwiesen und bei zu hoher Biegekraft brachen.
Aufgrund dieser Verholzungserscheinungen wurden qualitative und quantitative Analysen zum Lignifizierungsgrad vorgenommen. Bereits nach Trocknung einzelner Gewebebereiche waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Jeweils ein gleich großer Teil eines oberen Primärtriebs von Col-0 und *YUC8*ox wurde getrocknet (Abb. 3.15 A). Während der Wildtyp durch den Wasserverlust typische Welkeerscheinungen zeigte und an Volumen einbüßte, wies die Überexpressionslinie trotz vollständiger Trocknung keine Welke bzw. Volumenverringerung auf. Die qualitativen Ligninanalysen erfolgten mittels der Wiesner-Reaktion (2.12.1), wobei mit Hilfe von Phloroglucin und HCl ligninhaltige Bereiche rot gefärbt wurden. In Abbildung 3.15 B und C ist zu erkennen, dass die Überexpression von *YUC8* im Vergleich zu Col-0 zu einer deutlichen Rotfärbung führte und damit den erhöhten Ligningehalt des Gewebes aufzeigt.

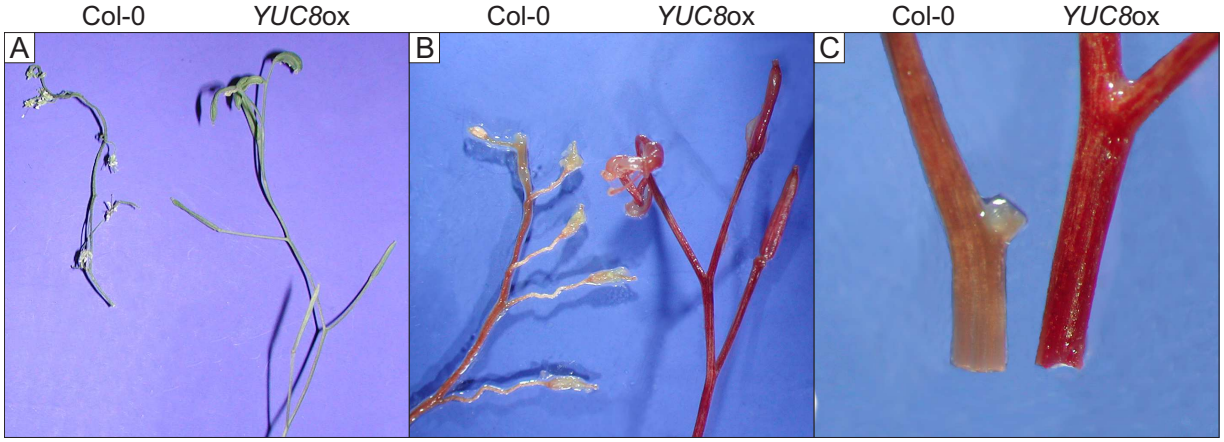


Abb. 3.15: Qualitative Ligninanalysen von *YUC8*ox
Dargestellt sind Bereiche von sechs Wochen alten *A. thaliana* Col-0-Wildtyppflanzen und *YUC8*ox im Vergleich nach Trocknung (A) und nach Ligninfärbung (B und C; 2.12.1). Die Intensität der Rotfärbung gibt dabei die Höhe des Ligningehalts an.

Zur Bestimmung des Verholzungsgrades der *YUC8*- und *YUC9*-Funktionsmutanten wurde der Ligningehalt photometrisch quantifiziert und mit Hilfe einer Lignin-Eichgerade auf das Gewicht des Pflanzenmaterials normiert (2.12.2). Für diese Versuchsreihe wurden zwei Wochen alte Keimlinge verwendet, welche auf ½MS-Medium angezogen

wurden (2.5.8). Die Abbildung 3.16 zeigt den verstärkenden Einfluss der *YUC8*- bzw. *YUC9*-Überexpression auf den Grad der Lignifizierung.
Ein weiterer markanter Phänotyp von *YUC8*ox und *YUC9*ox ist bezüglich der Wurzelhaare zu erkennen. In Abbildung 3.17 ist zu sehen, dass verglichen mit den Wurzeln von Wildtyppflanzen (A und D) die Wurzeln von *YUC8*ox (B und E) und *YUC9*ox (C und F) deutlich behaarter sind. Neben der langen und dichten Wurzelbehaarung fielen zudem die kurzen und verdickten Primärwurzeln auf. Linien von *YUC8*tap und *YUC9*tap zeigten ähnliche Merkmale des Wurzelphänotyps auf.
Die hergestellten Überexpressionslinien (3.4) sollten auch zur Aufreinigung von überexprimierten YUC8- und YUC9-Proteinen eingesetzt werden. Alle drei verwendeten Überexpressionssysteme wiesen ähnliche und reproduzierbare Besonderheiten im Phänotyp auf. Trotz verschiedener Aufarbeitungstechniken und Anzuchtmethoden (2.7.3) konnten keine Fusionsproteine detektiert werden. Analysiert wurden unter anderem Keimlinge im Alter von ein und zwei Wochen sowie Extrakte aus Blättern, Blüten und Wurzeln sechs Wochen alter Pflanzen. Die induzierbaren Linien *YUC8*ind bzw. *YUC9*ind wurden zuvor auf 10 µM β-Estradiol-haltigem Medium angezogen (2.5.14) oder nach Anzucht auf unsupplementiertem Medium 6 h lang mit 50 µM β-Estradiol behandelt, um die Expression zu induzieren. Zur Verhinderung möglicher Degradationen wurden während der Aufarbeitung die Proteaseinhibitoren Aprotinin, Benzamidin, Leupeptin, Pepstatin A, PMSF sowie der Complete Protease-Inhibitor-Mix der Firma Roche verwendet (2.7.3). Nach Aufarbeitung und Auftrennung des Proteingemischs (2.8.2) wurde versucht, die Fusionsproteine mit den Primärantikörpern anti-myc bzw. anti-YUC1 (*YUC8*ox/tap/ind, *YUC9*ox/tap/ind) sowie anti-His (*YUC8*tap, *YUC9*tap) zu detektieren (2.2.2).
Zur Detektion der Fusionsproteine wurde neben der Farbreaktion von NBT und BCIP auch die deutlich sensitivere Chemilumineszenzmethode mittels der Substrate SuperSignal West Pico bzw. SuperSignal West Femto verwendet, welche Proteine bis in den Femtogramm-Bereich detektieren können (2.8.4). Mittels SuperSignal West Pico konnten keine Signale ermittelt werden. Hingegen zeigte die Verwendung von SuperSignal West Femto bereits nach fünf Sekunden Exposition des Röntgenfilms ein deutliches Bandenmuster (ohne Abbildung). Bei dieser Immundetektion handelte es sich jedoch um unspezifische Signale, da die Bandenmuster von *YUC8*ox identisch mit denen der Wildtypkontrolle Col-0 waren. Weitere Versuche, die Fusionsproteine in den anderen Überexpressionslinien nachzuweisen, zeigten ebenfalls keine spezifische Detektion von YUC8- bzw. YUC9-Fusionsproteinen.

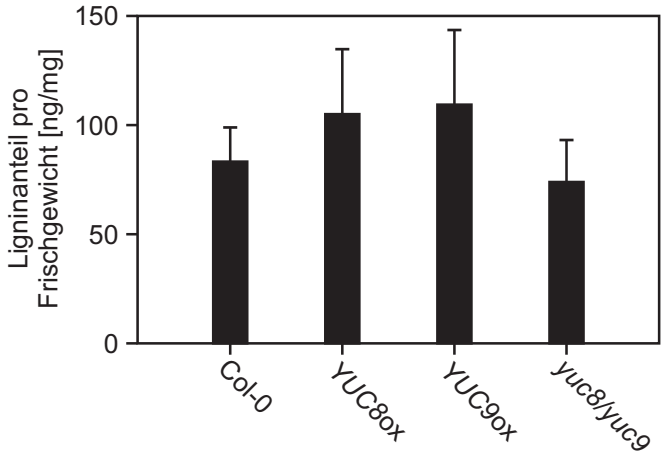


Abb. 3.16: Quantitative Ligninbestimmung nach Gabe von MeJA
Zu sehen ist die Lignin-Quantifizierung (2.12.2) von zwei Wochen alten *YUC8*- und *YUC9*-Funktionsmutanten. [Fehlerbalken $\pm SD$]

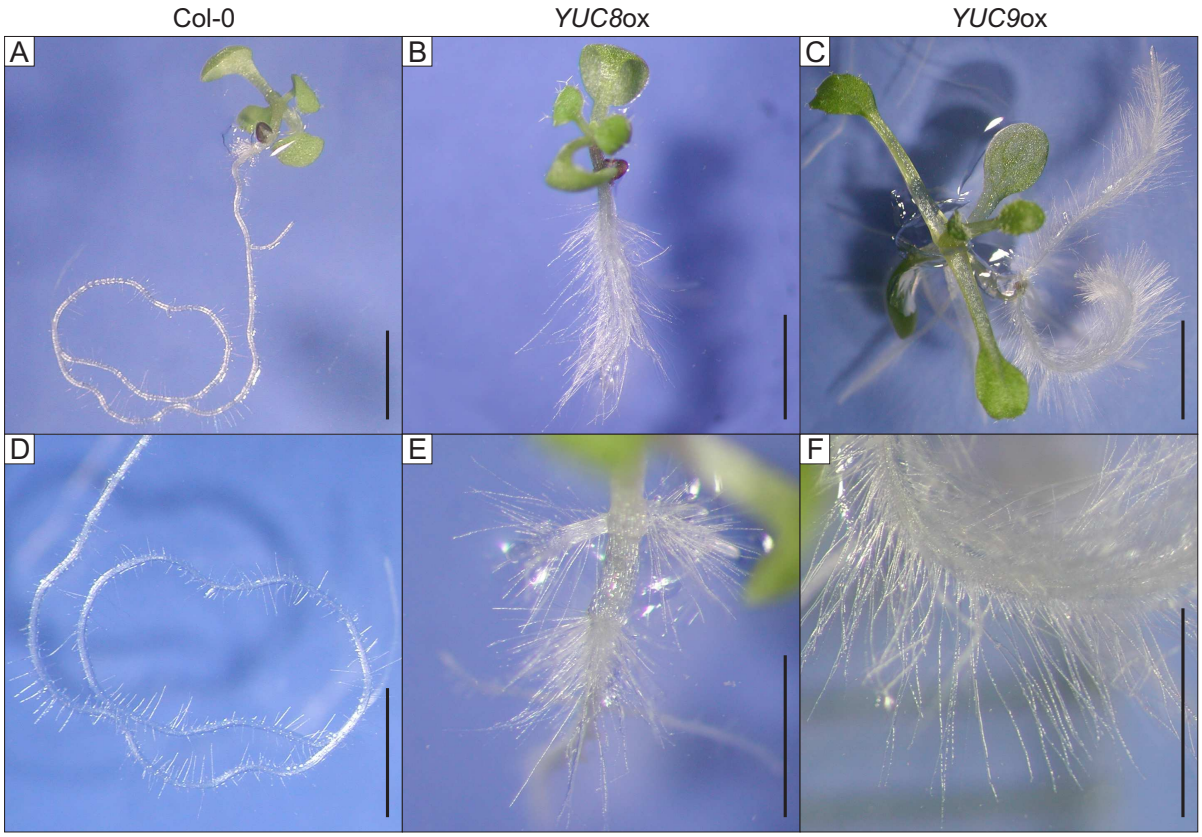


Abb. 3.17: Wurzelbehaarung bei *YUC8*- und *YUC9*-Überexpressionslinien
Col-0 (A und D), *YUC8*ox (B und E), *YUC9*ox (C und F) im Alter von zwei Wochen. Dargestellt sind Keimlingswurzeln, die nicht in das Medium hinein, sondern auf der Oberfläche wuchsen, wodurch die Intensität der Wurzelbehaarung ersichtlich wurde. [Maßstab 2 mm]

Neben den phänotypisch sichtbaren Ausprägungen wurden auch die Transkriptmengenänderungen in *YUC8*ox auf möglicherweise an der Regulation beteiligte Gene untersucht. Bei ARF-Proteinen („auxin response factors“) handelt es sich um aktivierende oder reprimierende Transkriptionsfaktoren, welche durch Bindung an auxinresponsive *cis*-Elemente Auxin-Antworten vermitteln [408]. Die Abbildung 3.18 A zeigt, dass eine Überexpression von *YUC8* zu einem erhöhten Transkriptgehalt von *ARF1*, *ARF2* und *ARF8* führt und somit über ARF-Faktoren möglicherweise Einfluss auf die Überexpression genommen wird.
Zudem erfolgte die Untersuchung anderer *YUC*-Mitglieder auf eine mögliche Octadecanoid-Verknüpfung. Kürzlich wurde von SUN *et al.* (2009) in einem Nebenversuch gezeigt, dass eine MeJA-Behandlung die *YUC2*-Expression verdoppelt [382]. Zur Untersuchung, ob sich die Expression von *YUC2* und anderen *YUC*-Genen ändert, wurde eine Induzierbarkeit mit Octadecanoiden untersucht. Es zeigten sich im Vergleich zu *YUC9* jedoch keine signifikanten Änderungen (ohne Abbildung). Ebenso weist *YUC2* keine Veränderung unter den weiteren untersuchten Bedingungen auf (Abb. 3.18 B).

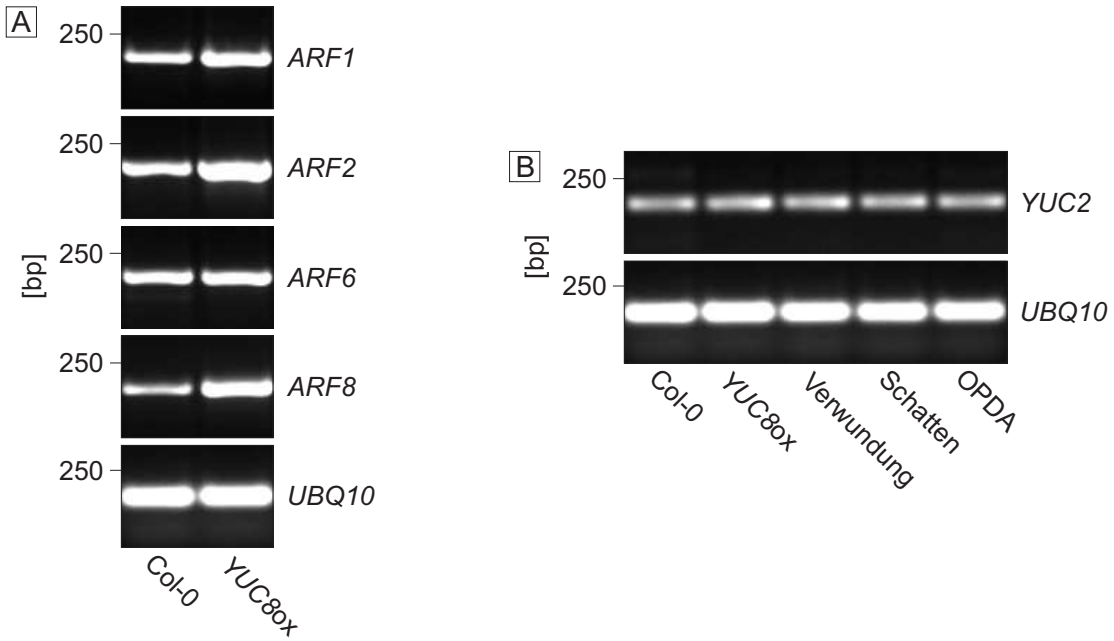


Abb. 3.18: Veränderte Transkripte der *ARF*-Gene in *YUC8*ox sowie Transkriptanalysen von *YUC2*
Die Gesamt-RNA einer *YUC8*-Überexpressionslinie wurde aufgearbeitet (2.6.6) und mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide (2.3.1) einer semiquantitativen Transkriptanalyse (2.6.10) von *ARF1*, *ARF2*, *ARF6* und *ARF8* im Vergleich zum Wildtyp unterzogen (A). B zeigt eine Auswahl von Transkriptstudien zu *YUC2* in *YUC8*ox und Col-0 nach Verwundung, Schatten- und OPDA-Behandlung (2.5.13). *UBQ10* diente als Referenzgen zur Mengenabschätzung.

3.6 Einfluss ausgewählter Zusatzstoffe auf das Wurzelwuchsverhalten von *YUC8*- und *YUC9*-Funktionsmutanten

Die Untersuchung des Wurzelwuchsverhaltens von Überexpressionslinien und Nullmutanten auf supplementiertem Medium lieferte weitere Informationen über die mögliche physiologische Funktion von *YUC8* und *YUC9*. Ausführliche Transkriptanalysen zeigten einen Einfluss von Octadecanoiden auf die Regulation von *YUC8* und *YUC9* (3.2.3). Um diese Fragestellung näher zu betrachten, wurden Keimlinge zur Analyse der Wurzellänge auf senkrecht stehenden ½MS-Platten angezogen (2.5.14) und die Keimlingsparameter nach zwei Wochen Wachstum ausgewertet (2.5.8).

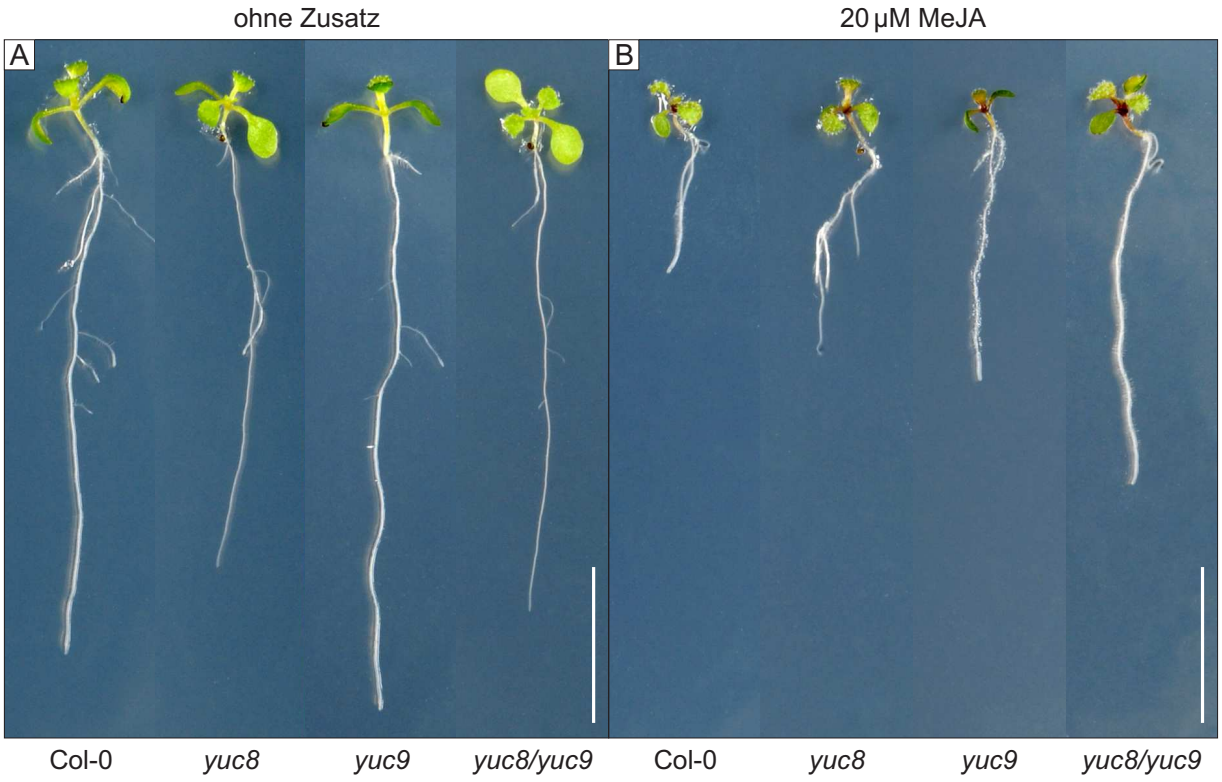


Abb. 3.19: Einfluss von MeJA auf das Wurzelwachstum von *YUC8*- und *YUC9*-Nullmutanten
Die Keimlinge wurden auf senkrecht stehenden ½MS-Platten ohne Zusatz (A) und supplementiert mit 20 µM MeJA (B) angezogen (2.5.8, 2.5.14). Die Fotodokumentation erfolgte nach zwei Wochen (2.13). Dargestellt ist jeweils ein für die untersuchte Gruppe repräsentativer Keimling. [Maßstab 1 cm]

In Abbildung 3.19 ist jeweils ein Keimling repräsentativ für den Wildtyp Col-0, die Einzel-Nullmutanten *yuc8* und *yuc9* sowie die Doppel-Nullmutante *yuc8/yuc9* dargestellt. Auf ½MS-Medium ohne Zusatz sind die biologischen Schwankungen der Wurzellängen

ersichtlich. Die Supplementation des Wuchsmediums mit 20 µM MeJA bewirkte eine ausgeprägte Veränderung des Wurzelwuchses.
Um eine signifikante Aussage treffen zu können, wurden zwei Wochen alte Keimlinge mit Hilfe der Software ImageJ vermessen und anschließend statistisch ausgewertet (2.14, 2.15). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 zusammengefasst. Auf unsupplementiertem Medium zeigten die Nullmutanten nur geringe Unterschiede in der Wurzellänge relativ zu Col-0 (Abb. 3.20 A). *YUC8*ox und *YUC9*ox wiesen dagegen signifikant verkürzte Primärwurzeln auf. Unter Einfluss von 20 µM MeJA wurde der Unterschied in der Wurzelentwicklung insbesondere bei den Nullmutanten deutlich. So zeigten sowohl die Einzel- als auch die Doppelmutanten eine höhere Toleranz gegenüber MeJA. Während schon bei den Einzelmutanten *yuc8* und *yuc9* eine verlängerte Primärwurzel verzeichnet werden konnte, war die Wurzellänge der Doppelmutante *yuc8/yuc9* mehr als doppelt so lang (20 mm), verglichen mit Col-0 (9 mm). Die Wurzeln von *YUC8*ox und *YUC9*ox zeigten verglichen mit den anderen Linien eine geringere Abnahme der Wurzellänge. Ohne MeJA erreichten die Überexpressionslinien etwa 40 % der Wurzellänge von Col-0. Mit Supplementation von 20 µM MeJA ist das Längenverhältnis zu Col-0 auf über 75 % angestiegen.
Damit weitere Aussagen über die physiologische Funktion von *YUC8* und *YUC9* getroffen werden konnten, wurden weitere Parameter bestimmt. So zeigten die Nullmutanten verglichen mit dem Wildtyp weniger und die Überexpressionslinien mehr Seitenwurzeln auf (Abb. 3.20 B). Die Anzahl der Seitenwurzeln wurde in Beziehung zur Gesamtwurzellänge gesetzt und die spezifische Seitenwurzeldichte ermittelt (Abb. 3.20 D). Hier zeigte sich im Vergleich zu Col-0 eine ähnliche Seitenwurzeldichte für *yuc8* und eine signifikant geringere für *yuc9* und *yuc8/yuc9*. Durch die generell verkürzten Wurzeln von *YUC8*ox und *YUC9*ox zeigten beide eine über dreifach erhöhte Seitenwurzeldichte verglichen mit dem Wildtyp. Die Vermessung der Hypokotyl- und Petioluslängen ergab für die Nullmutanten kürzere sowie für die Überexpressionslinien höhere Werte, wobei bei *YUC8*ox die Petiolen und bei *YUC9*ox die Hypokotyle im Wachstum bevorzugt wurden (Abb. 3.20 C).
Arbeiten an YUC1- und YUC6-Isoenzymen haben gezeigt, dass die Überexpressionslinien weniger sensitiv auf das phytotoxische Tryptophan-Analogon 5-Methyltryptophan (5-MT) reagieren und aufgrund dessen eine Reaktion von YUC1 und YUC6 in einem Trp-abhängigen Synthesweg postuliert wurde [190, 455]. Um YUC8 und YUC9 in ihrer Funktion zu charakterisieren und zu analysieren, in welchen Reaktionswegen sie eine Rolle spielen könnten, wurde die Wurzelentwicklung von Col-0, *YUC8*ox und *YUC9*ox

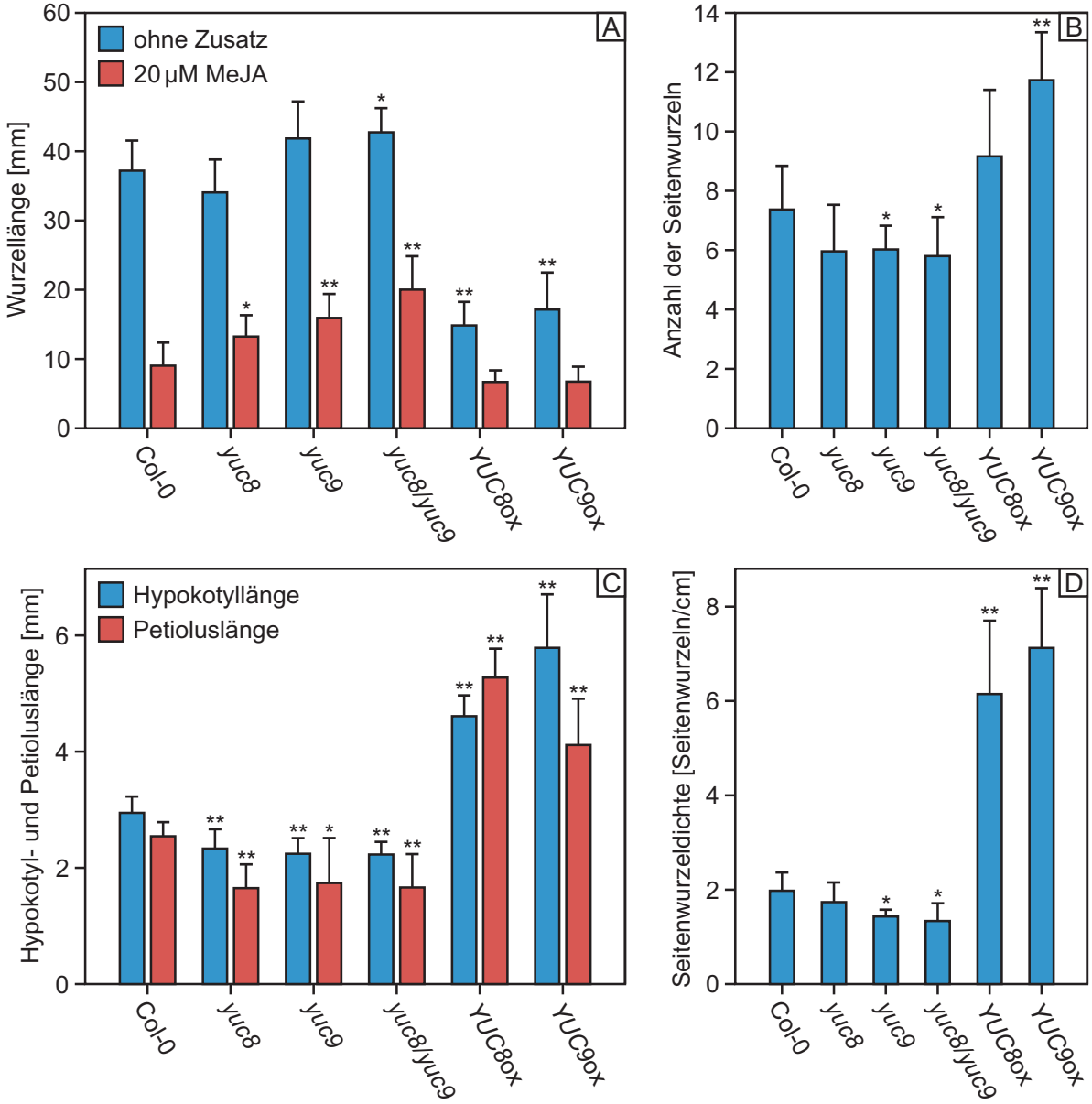


Abb. 3.20: Statistische Charakterisierung von *YUC8*- und *YUC9*-Funktionsmutanten im Keimlingsstadium

Von den in Abbildung 3.19 beschriebenen Keimlingen wurden jeweils 24 Exemplare hinsichtlich ihrer Primärwurzellänge mit und ohne Supplementation mit 20 µM MeJA vermessen (A). Zudem wurde die Seitenwurzelanzahl (B), die Hypokotyl- und Petioluslänge (C) sowie die Seitenwurzeldichte (D) bestimmt und statistisch auf ihre Signifikanz überprüft (2.14). [Fehlerbalken $\pm SD$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, $n = 24$]

auf supplementierten Medien untersucht. Hierfür wurden die Keimlinge auf senkrechten ½MS-Platten ohne Zusätze als Kontrolle bzw. mit den Zusatzstoffen Indol-3-acetamid (1, 10, 100 µM IAM), Tryptamin (1, 10, 100 µM TAM), Indol-3-essigsäure (0,05, 0,5, 5 µM IES), α-Aminoisobuttersäure (5, 20, 50 mM AIB) sowie 5-MT (10, 50, 100 µM) angezogen (2.5.14). Nach zwei Wochen erfolgte die Auswertung der Wurzellängen (2.13).

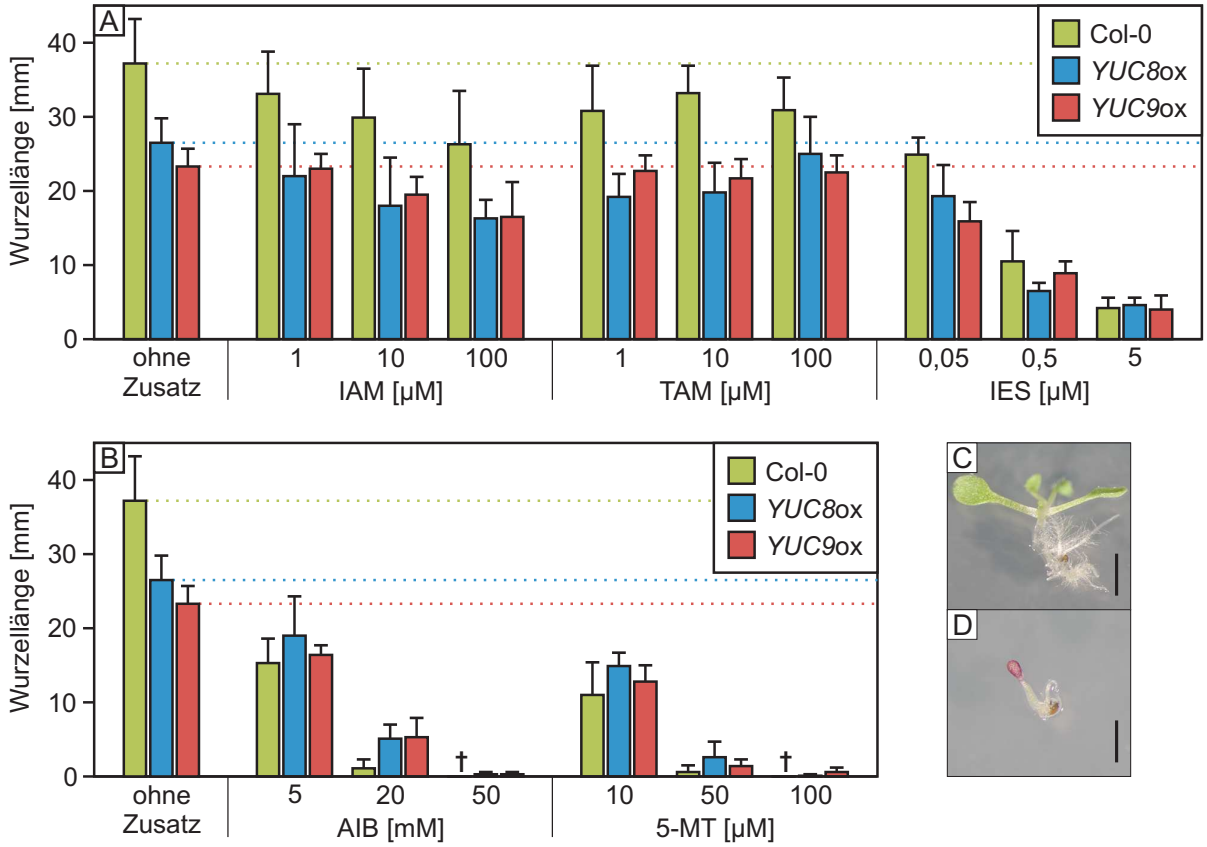


Abb. 3.21: Einfluss von Zusatzstoffen auf die Wurzelentwicklung von *YUC8*ox und *YUC9*ox im Vergleich zum Wildtyp
Nach zweiwöchiger Anzucht von Col-0, *YUC8*ox und *YUC9*ox auf senkrechten gestellten ½MS-Platten mit den aufgeführten Zusatzstoffen (2.5.14) wurden die Wurzellängen dokumentiert (2.13). Die Konzentrationen der eingesetzten Zusätze IAM, TAM, IES, AIB und 5-MT sind den Diagrammen zu entnehmen (A und B). Als Vergleich diente ½MS-Medium ohne Zusätze. In C und D sind exemplarisch *YUC8*ox (C) und Col-0 (D) auf 50 µM 5-MT abgebildet. [A und B: Fehlerbalken $\pm SD$, † letale Dosis; C und D: Maßstab 2 mm]

Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 3.21 A und B dargestellt. Bei Supplementation mit verschiedenen Konzentrationen von IAM konnte sowohl bei Col-0 als auch bei *YUC8*ox und *YUC9*ox eine prozentual vergleichbare Abnahme der Wurzellängen beobachtet werden. Verschiedene TAM-Konzentrationen übten ebenfalls keinen

Einfluss auf das Wuchsverhalten aus. Steigende IES-Konzentrationen haben allgemein einen wachstumshemmenden Effekt auf die Wurzel. Bei den Überexpressionslinien und dem Wildtyp führte die Dosissteigerung zu einer Anpassung der Wurzellängen bis zu einer identischen Länge bei einer Konzentration von 5 µM IES. Col-0 reagierte prozentual gesehen sensitiver auf IES als *YUC8*ox bzw. *YUC9*ox, was auf einen bereits erhöhten IES-Gehalt der Überexpressionslinien schließen lässt.
Bereits geringe Dosen an AIB bewirkten im Vergleich zu den Überexpressionslinien eine kürzeres Wurzelwachstum bei Col-0. Hohe AIB-Konzentrationen führten zu einer kompletten Letalität des Wildtyps, während *YUC8*ox und *YUC9*ox noch ein geringes Wachstum aufwiesen. Eine ähnlich hohe Sensitivität des Wildtyps im Vergleich zu den Überexpressionslinien zeigten Studien mit steigenden 5-MT-Konzentrationen. In Abbildung 3.21 C und D ist beispielhaft ein Keimling von *YUC8*ox und Col-0 auf ½MS-Medium mit 50 µM 5-MT dargestellt.
Die temporäre Änderung der Wachstumsrichtung sollte den Einfluss von Überexpression bzw. Genverlust von *YUC8* und *YUC9* auf das gravitrope Wachstumsverhalten der Wurzel zeigen. Hierfür wurden Keimlinge von Col-0, *YUC8*ox, *YUC9*ox und *yuc8/yuc9* auf senkrecht gestellten ½MS-Platten angezogen (2.5.8). Nach fünf Tagen wurden die Petrischalen mit Aluminiumfolie verdunkelt und um 135 ° gedreht. Einen Tag später erfolgte die Dokumentation der Wurzeln (2.13). Abweichungen zur positiv gravitropen Wachstumsrichtung wurden in 30 °-Schritten in Abbildung 3.22 dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass der Genverlust von *YUC8* und *YUC9* einen schwachen Einfluss auf das gravitrope Verhalten der Wurzel hatte. Die *yuc8/yuc9*-Doppelmutante zeigte Abweichungen des Normalverhaltens von knapp 30 % in beide Richtungen.
Weiterhin wurden Studien mit einem Zeitraffer-System durchgeführt. Hierfür wurde in einem präparierten Lichtschrank mittels Computer, Kamera und entsprechenden Programmen alle 10 min automatisiert ein Bild der Keimlinge/Pflanzen aufgenommen. Nach Zusammenfügen der Bilder konnte das Wachstum in einem Zeitraffervideo mit 600 – 2400-facher Geschwindigkeit (entsprechen 25 – 100 Hz Bildrate, etwa 4 – 16 h Wachstumszeit pro Sekunde) analysiert werden. Neben den bereits beschriebenen veränderten Entwicklungseigenschaften wurden während des Wachstums der Keimungszeitpunkt, das Reagieren der Wurzeln auf Hindernisse, die Anzahl der Rosettenblätter sowie der Zeitpunkt der Primärtriebbildung untersucht. Als Analyseobjekte dienten *yuc8/yuc9* sowie *YUC8*ox und *YUC9*ox im Vergleich zu Col-0. Bis auf die bereits geschilderten Eigenschaften konnten in den Zeitrafferstudien keine maßgeblichen Veränderungen außerhalb der üblichen biologischen Schwankungen festgestellt werden (ohne Abbildung).

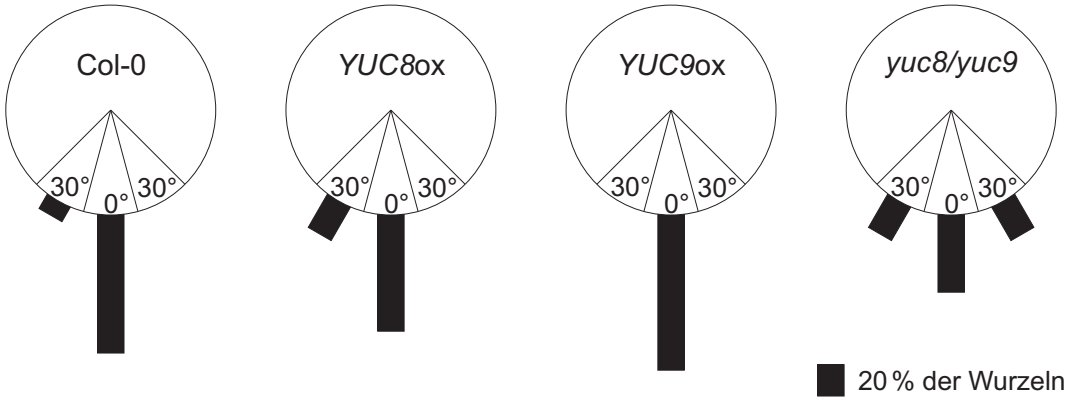


Abb. 3.22: Untersuchung des Wurzelgravitropismus bei Überexpression und Genverlust von *YUC8* und *YUC9*
Nach fünftägiger, senkrechter Anzucht (2.5.8) wurden Keimlinge von Col-0, *YUC8*ox, *YUC9*ox und *yuc8/yuc9* mit Alufolie abgedunkelt und um 135 ° gedreht. Das veränderte Wurzelwachstum wurde nach einem Tag dokumentiert und die Abweichung des gravitropen Wuchsverhaltens in 30 °-Schritten angegeben. [$n = 25$]

3.7 Quantifizierung von IES-Gehalten in Überexpressionspflanzen und Nullmutanten

Die durchgeführten Analysen und beobachteten Phänotypen weisen auf einen Zusammenhang von *YUC8* bzw. *YUC9* mit Indol-3-essigsäure (IES), dem Hauptauxin in Pflanzen, hin. Die Überexpressionslinien führten z.B. zu Auxin-Überproduzierer-Phänotypen, wie sie bereits für andere *YUC*-Überexpressionsmutanten beschrieben wurden [190, 455]. Zur Bestätigung dieser phänotypischen Befunde wurden die IES-Gehalte von jeweils drei Linien von *YUC8*ox und *YUC9*ox im Vergleich zum Wildtyp Col-0 quantifiziert. Hierfür wurden Keimlinge steril angezogen (2.5.8) und nach sieben Tagen für GC-MS/MS-Analysen aufgearbeitet (2.10). In Abbildung 3.23 sind die freien und konjugierten IES-Gehalte relativ zu Col-0 dargestellt. Die konjugierte IES wies in *YUC8*ox gesteigerte Mengen auf, während bei *YUC9*ox nur eine geringe Zunahme verzeichnet wurde. Hingegen zeigte sich bei der physiologisch aktiven Form, der freien IES, dass diese bei allen sechs getesteten Überexpressionslinien mit 150 – 200 %, relativ zur IES-Menge im Wildtyp, deutlich erhöht war, was im Rahmen bereits publizierter Daten zu anderen *YUC*-Überexpressionsmutanten liegt [442, 455].
Ein zentraler Punkt dieser Arbeit war die Fragestellung, ob es eine Octadecanoid-induzierte Auxinbiosynthese gibt und wenn ja, welchen Anteil *YUC8* und *YUC9* daran haben. Zur Beantwortung dieser Frage wurden in einer Versuchsreihe in Summe 30 000

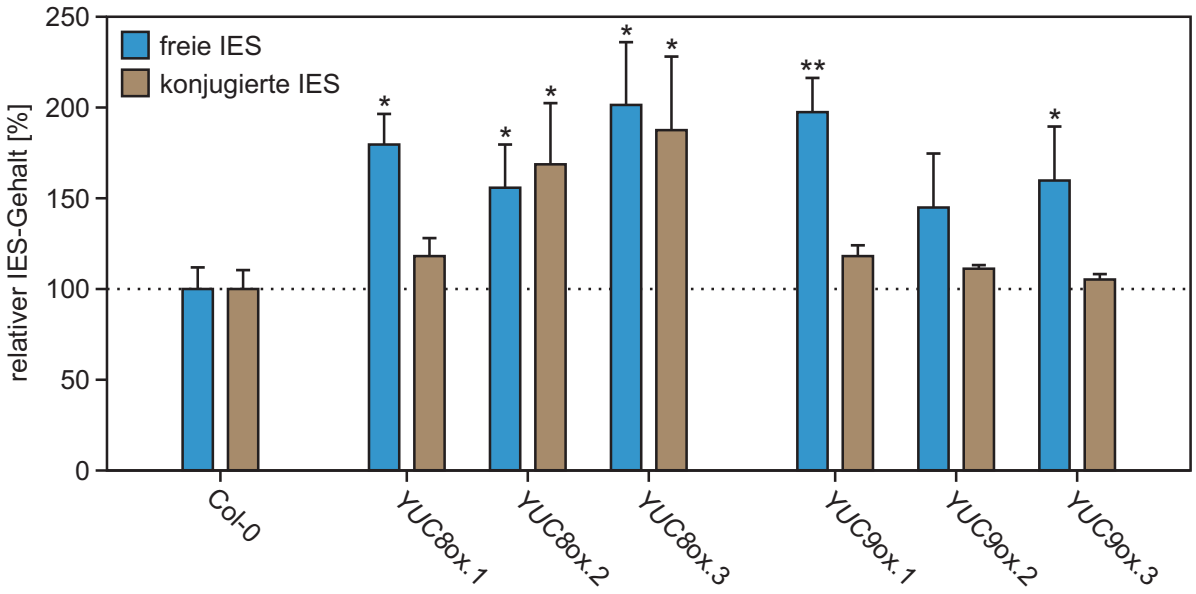


Abb. 3.23: Endogene IES-Gehalte in *YUC8*ox und *YUC9*ox
Nach siebentägiger Anzucht unter Kurztagbedingungen (2.5.8) wurden die Keimlinge von Col-0 und jeweils drei Linien von *YUC8*ox und *YUC9*ox für GC-MS/MS-Messungen aufgearbeitet (2.10). Dargestellt sind die Gehalte freier und konjugierter IES relativ zum Wildtyp nach statistischer Auswertung (2.14). Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit je fünf Messungen reproduziert. [Fehlerbalken $\pm SD$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$]

Samen von *Col-0*, *yuc8*, *yuc9* sowie *yuc8/yuc9* ausgelegt und die Keimlinge für sieben Tage unter Kurztagbedingungen angezogen (2.5.8). Anschließend erfolgte für 6 h die Octadecanoid-Behandlung mit 50 µM MeJA bzw. als Kontrolle mit dem entsprechenden Lösungsmittel (2.5.13). Daraufhin wurden die Keimlinge in Kotyledonen, Hypokotyl und Wurzel aufgetrennt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels GC-MS/MS der Gehalt an freier IES bestimmt (2.10). Die hohe Anzahl der verwendeten Keimlinge war aufgrund der überaus geringen Wurzel- und Hypokotylmasse bei sieben Tage alten Keimlingen erforderlich, um genügend Pflanzenmaterial für mindestens fünf GC-MS/MS-Messungen zu erhalten. In Abbildung 3.24 sind die Gehalte freier IES nach statistischer Auswertung aufgeführt (2.14). Innerhalb der mit der Lösungsmittelkontrolle behandelten Linien zeigten sich bei den Kotyledonen keine signifikanten Unterschiede. In den Hypokotylen enthielten sowohl die Einzelmutanten als auch die Doppelmutante signifikant geringere Mengen an freier IES. Die Wurzeln zeigten insbesondere für *yuc8* und *yuc8/yuc9* geringere IES-Gehalte auf. Die Messungen nach Induktion mit MeJA wiesen in allen Bereichen eine Zunahme freier IES auf, wobei der IES-Anstieg in den Nullmutanten geringer ausfiel.

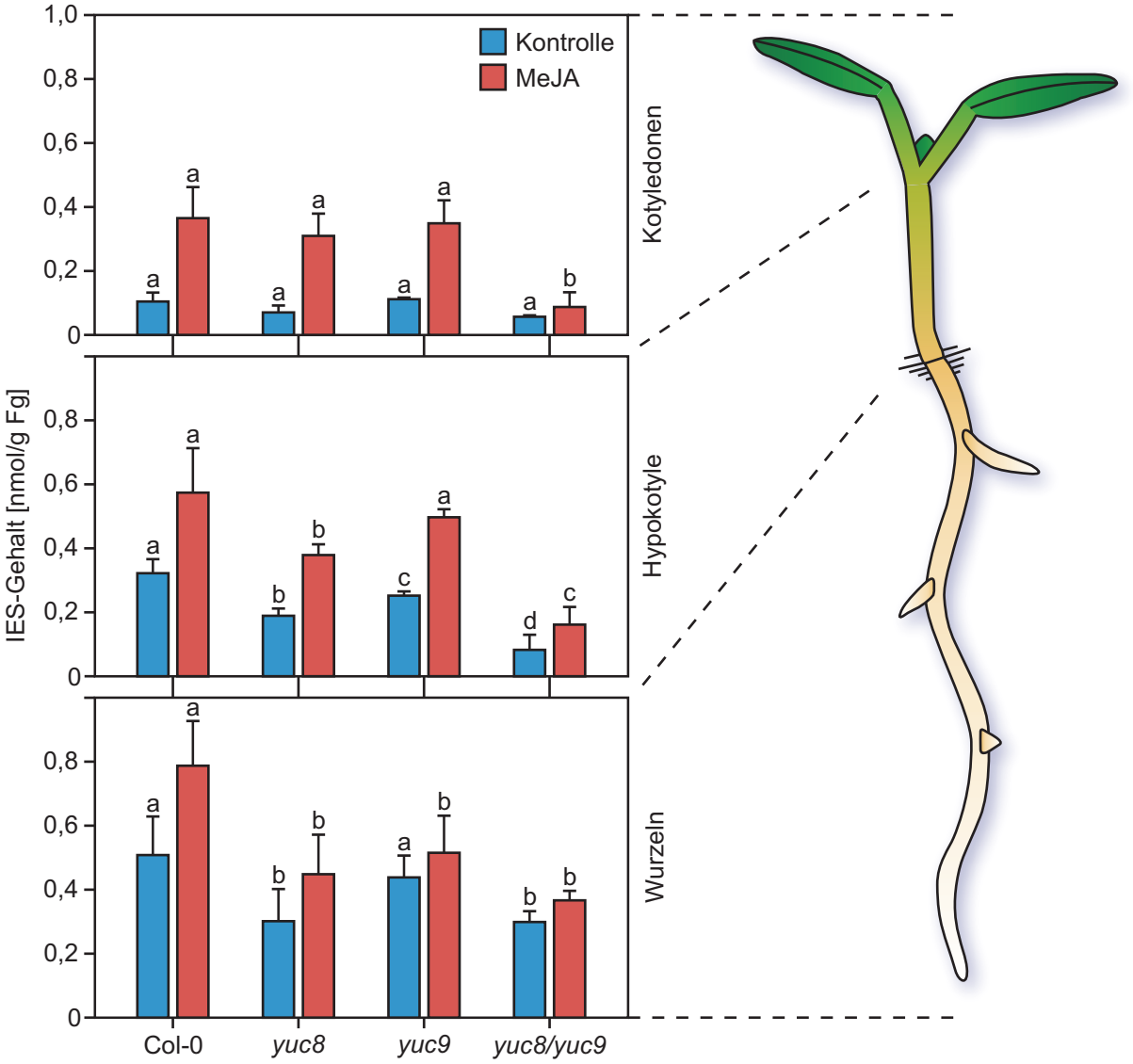


Abb. 3.24: IES-Bildung in jungen Keimlingen nach MeJA-Behandlung
Keimlinge von Col-0, *yuc8*, *yuc9* und *yuc8/yuc9* wurden für sieben Tage unter Kurztagbedingungen angezogen (2.5.8) und für 6 h mit 50 µM MeJA bzw. der Kontrolle behandelt (2.5.13). Anschließend erfolgte die Aufteilung der Keimlinge in ihre drei Organe (Kotyledonen, Hypokotyle und Wurzeln). Die Messung freier IES erfolgte mittels GC-MS/MS (2.10). Es wurden je Linie 500 Keimlinge in jeweils fünf Messungen in drei Versuchsreihen analysiert. Signifikante Unterschiede innerhalb einer Messreihe (Kontrolle bzw. MeJA) sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. [Fehlerbalken $\pm SEM$, a – d $p \leq 0,05$]

Die Abbildung 3.25 gibt die produzierte Menge freier IES nach MeJA-Behandlung an. Die Prozentangaben im Diagramm beziehen sich auf die MeJA-induzierte IES-Bildung im Wildtyp. In den Kotyledonen zeigten sich bei den Einzelmutanten keine signifikanten Unterschiede in der MeJA-induzierten IES-Synthese. Hingegen war dieser Mechanismus in der Doppelmutante *yuc8/yuc9* mit lediglich 18 % gebildeter IES nach Induktion im Vergleich zu Col-0 deutlich eingeschränkt. Ähnliches zeigte sich für die analysierten Hypokotyle. Während die Einzelmutanten *yuc8* und *yuc9* keine signifikanten Veränderungen aufzeigten, sank die Induktionsfähigkeit bei *yuc8/yuc9* auf 31 %. In den Wurzeln lag bereits bei *yuc8* und *yuc9* mit 58 und 44 % eine Einschränkung vor. Der Verlust beider Gene in *yuc8/yuc9* ließ die MeJA-induzierte IES-Bildung weiter auf 40 % sinken, wobei erst in *yuc9* und *yuc8/yuc9* eine signifikante Einschränkung zu verzeichnen war.

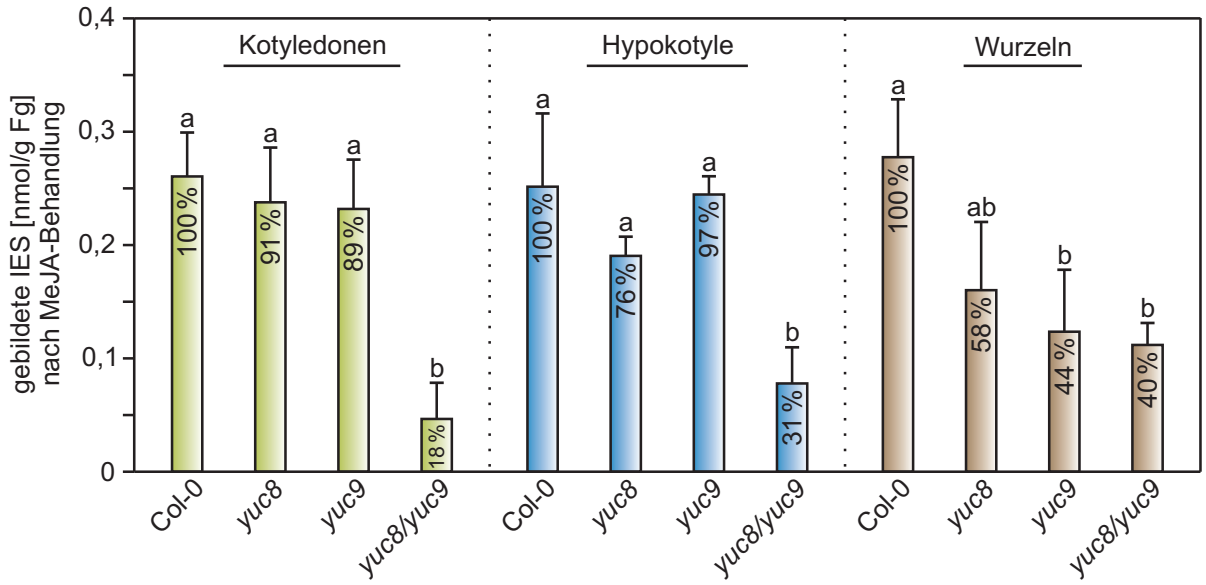
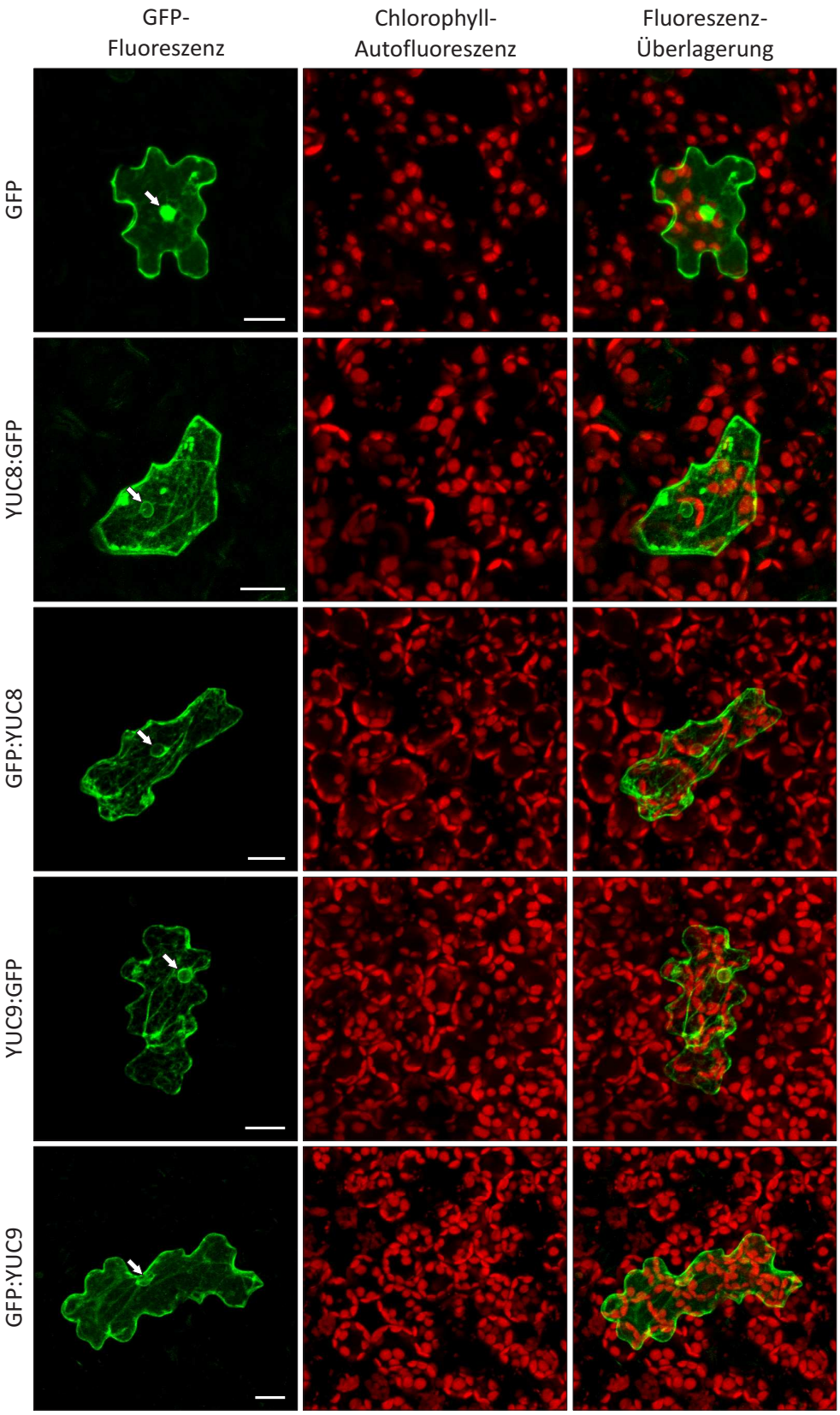


Abb. 3.25: Relativer IES-Anstieg nach Induktion mit MeJA in Col-0, *yuc8*-, *yuc9*- und *yuc8*/*yuc9*-Nullmutanten
Die in Abb. 3.24 gezeigten Ergebnisse wurden weiter statistisch zusammengefasst (2.14). Dargestellt ist die Zunahme freier IES nach MeJA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Die Prozentangaben innerhalb der Diagrammbalken beziehen sich auf den gebildeten IES-Gehalt eines Gewebebereichs relativ zu Col-0. Signifikante Unterschiede untereinander sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. [Fehlerbalken $\pm SEM$, a und b $p \leq 0,05$]

3.8 Subzelluläre Lokalisation von YUC8 und YUC9 mit Hilfe von GFP-Fusionskonstrukten

Die pflanzliche Zelle verfügt über mehrere Kompartimente, so dass auf kleinstem Raum unterschiedliche Stoffwechselreaktionen ermöglicht werden. Die Kenntnis des Wirkorts von uncharakterisierten Proteinen hilft dabei, die physiologischen bzw. enzymatischen Eigenschaften auf den jeweiligen Zellbereich einzugrenzen. Um herauszufinden, wo YUC8 und YUC9 in der Zelle lokalisiert sind, wurden subzelluläre Lokalisationsstudien mit N- und C-terminalen GFP-Fusionskonstrukten durchgeführt. Hierfür wurden Vektoren erstellt, die eine Überexpression der GFP-Fusionsproteine in pflanzlichen Organismen erlauben. Die Klonierungsstrategie ist im Anhang in Abbildung 6.6 zusammengefasst. Die Konstrukte p35S-YUC8-GFP bzw. p35S-YUC9-GFP codieren für die C-terminalen GFP-Fusionsproteine YUC8:GFP bzw. YUC9:GFP, während die N-terminale GFP-Fusion mittels p35S-GFP-YUC8 bzw. p35S-GFP-YUC9 (GFP:YUC8 bzw. GFP:YUC9) ermöglicht wurde. Die konstitutive Überexpression wurde in allen vier Konstrukten durch einen *35S*-Promotor gewährleistet.
Zur subzellulären Lokalisation wurden *A.-thaliana*- und Tabakpflanzen angezogen (2.5.8). Bei *A. thaliana* wurden die Blätter drei Wochen alter Pflanzen transformiert. Bei *N. tabacum* erfolgte die Transformation 1 cm großer Blattscheiben junger Blätter. Nach biolistischer Einbringung der Fusionskonstrukte in die Epidermiszellen (2.5.12) wurden die *A.-thaliana*-Pflanzen bzw. die *N.-tabacum*-Blattscheiben für 24 h unter Langtagbedingungen inkubiert, um eine transiente Expression der GFP-Fusionsproteine zu ermöglichen. Die späteren Fluoreszenz-Analysen erfolgten am konfokalen „Laser-Scanning"-Mikroskop LSM 510 META (2.13).
In Abbildung 3.26 ist die intrazelluläre Lokalisation N- und C-terminaler GFP-Fusionsproteine mit YUC8 und YUC9 in *A.-thaliana*-Epidermiszellen dargestellt. Die GFP-Kontrolle zeigte sowohl eine Lokalisation im Cytoplasma als auch im Zellkern. Im Gegensatz zur Kontrolle erfolgte bei den YUC8- und YUC9-GFP-Fusionsproteinen

Abb. 3.26 *(auf der nächsten Seite)*:
Subzelluläre Lokalisation von YUC8 und YUC9 *in planta*
Die Abbildung zeigt *A.-thaliana*-Epidermiszellen 24 h nach biolistischer Transformation (2.5.12) mit den GFP-Fusionskonstrukten (Abb. 6.6) und der GFP-Kontrolle pUC-GFP-C, welche unfusionierte GFP-Proteine exprimiert. Die spezifische GFP-Fluoreszenz sowie die Chlorophyll-Autofluoreszenz wurden mit Hilfe eines konfokalen „Laser-Scanning"-Mikroskops aufgenommen (2.13). Die weißen Pfeile markieren den jeweiligen Zellkern. [Maßstab 20 µm]


GFP-
Fluoreszenz
Chlorophyll-
Autofluoreszenz
Fluoreszenz-
Überlagerung
GFP
YUC8:GFP
GFP:YUC8
YUC9:GFP
GFP:YUC9

kein aktiver Transport bzw. keine passive Diffusion über die Kernporen in den Zellkern. Die Fluoreszenz-Überlagerung mit der Chlorophyll-Autofluoreszenz zeigte keine Überlagerung mit den Chloroplasten. Auch konnte anhand der Daten ein Import in andere Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen ausgeschlossen werden. Alle YUC8- und YUC9-GFP-Fusionsproteine waren exklusiv im Cytoplasma lokalisiert. Die Fluoreszenzanalysen mit den *N.-tabacum*-Blattscheiben bestätigten die Ergebnisse und zeigten für die Fusionsproteine ein ausschließliches Vorkommen im Cytoplasma (ohne Abbildung).

3.9 Promotor-GUS-Reportergen-Studien

Neben den durchgeführten Transkript- und GFP-Studien (3.2, 3.8) bieten insbesondere Promotor-Reportergen-Analysen weitreichende Möglichkeiten zur näheren Charakterisierung der physiologischen Funktion von *YUC8* und *YUC9*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *YUC8*- bzw. *YUC9*-Promotor mit dem für die β-Glucuronidase codierenden Gen *uidA* (*GUS*) fusioniert. Nach Einbringung der Promotor-*GUS*-Fusionen in *A. thaliana* konnte mit Hilfe histochemischer GUS-Studien die endogen gesteuerte Promotoraktivität *in planta* untersucht werden. Neben entwicklungsabhängigen Studien wurde auch der Einfluss biotischer und abiotischer Faktoren auf die Promotoraktivität von *YUC8* und *YUC9* analysiert.

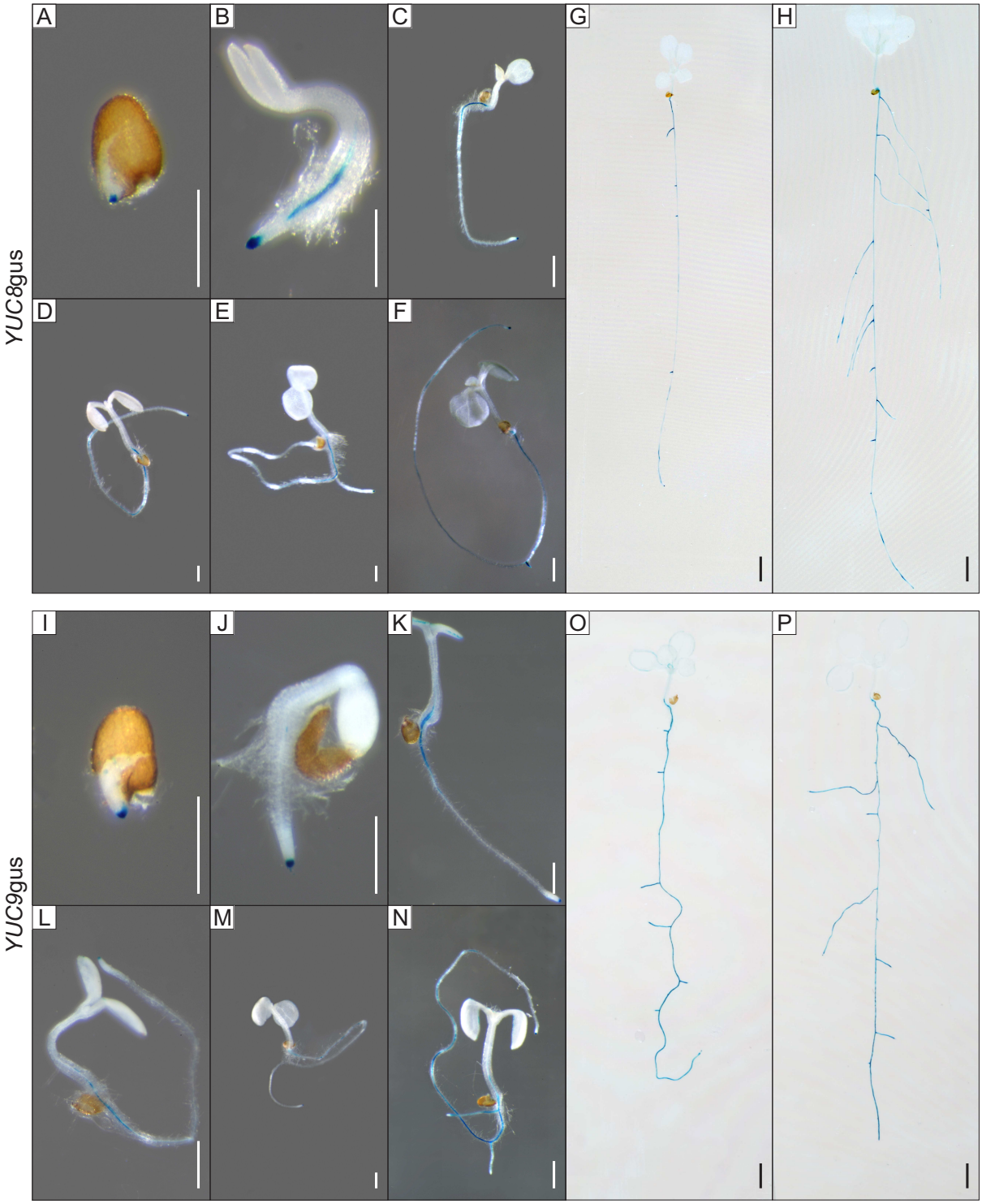
3.9.1 Herstellung von *YUC8*- und *YUC9*-Promotor-Reportergenlinien

Zur Analyse der spezifischen Promotoraktivität von *YUC8* und *YUC9* wurden entsprechende Plasmide erstellt. Die Strategie zur Herstellung geeigneter Promotor-Reportergenkonstrukte ist im Anhang in Abbildung 6.7 zusammengefasst. Basierend auf Analysen zur möglichen Promotorregion [161], wurde die Gensequenz 3 kbp stromaufwärts sowie die ersten sechs Basentripletts von *YUC8* bzw. *YUC9* aus *A. thaliana* in pSP-ENTR2-GUS eingebracht. Über einen nachfolgenden Rekombinationsschritt wurde schließlich pD1-YUC8Prom3kb-GUS bzw. pD1-YUC9Prom3kb-GUS erhalten. Nach stabiler Transformation der Konstrukte in *A. thaliana* (2.5.11) folgte die Selektion des erhaltenen Saatguts mittels BASTA® (2.5.8). Es wurden jeweils vier unabhängige Linien über zwei Generationen angezogen, um homozygotes Saatgut zu erhalten. Stabile Promotor-Reportergen-Pflanzen sind mit *YUC8*gus bzw. *YUC9*gus angegeben (2.4.2). Damit die Färbe-Intensitäten untereinander vergleichbar sind, wird in den folgenden Abbildungen jeweils eine untersuchte *YUC8*gus- bzw. *YUC9*gus-Linie dargestellt. Die parallel untersuchten Linien zeigten identische Effekte.

3.9.2 Entwicklungsabhängige *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität

Zur entwicklungsabhängigen Charakterisierung von *YUC8*gus und *YUC9*gus wurden die transgenen Linien von der Aussaat bis hin zu den typischen Entwicklungsstufen adulter Pflanzen untersucht. Die Untersuchung der einzelnen Keimlingsstadien erfolgte unter Kurztagbedingungen (2.5.8). Alle 24 h wurden Keimlinge über die GUS-Reaktion histochemisch gefärbt und die Reportergenaktivität dokumentiert (2.11, 2.13). In Abbildung 3.27 sind ausgewählte Zeitpunkte der Keimlingsentwicklung zu sehen. Frisch stratifizierte Keimlinge zeigten keine GUS-Aktivität (ohne Abbildung). Jedoch begann bereits einen Tag nach Aussaat die Promotoraktivität von *YUC8* und *YUC9* in der austreibenden Wurzelspitze der Radicula (Abb. 3.27 A und I). Sowohl bei *YUC8*gus als auch bei *YUC9*gus blieb die Primärwurzelspitzenaktivität in den wachsenden Keimlingen erhalten (Abb. 3.27). Ebenfalls in der Abbildung zu sehen ist die beginnende Promotoraktivität im oberen Wurzelbereich nach zwei bzw. drei Tagen (B und K). Zum Zeitpunkt der Ausbildung von Sekundärwurzeln nach sieben Tagen zeigte sich der erste Unterschied zwischen *YUC8* und *YUC9* (Abb. 3.27 F und K). Während die Färbung bei *YUC8*gus besonders prägnant in der sich entwickelnden Seitenwurzel ist, schien die *GUS*-Expression bei *YUC9*gus in den Sekundärwurzel-Initiationsbereichen der Primärwurzel verstärkt zu sein. Ältere Keimlinge zeigten für *YUC8*gus eine intensive Promotoraktivität in den frühen Bereichen der Seitenwurzel (Abb. 3.27 G und H), während die Aktivität in *YUC9*gus mit Ausnahme der Elongationszone ubiquitär in der Wurzel verbreitet war (Abb. 3.27 O und P).
Zur Darstellung der Promotoraktivität in adulten Pflanzen wurden sechs Wochen alte *YUC8*gus bzw. *YUC9*gus histochemisch gefärbt. Ein verstärkter GUS-Färbegrad trat innerhalb der *YUC8*gus-Wurzel nur wenige Millimeter im Anfangsbereich der Sekundärwurzeln auf (ohne Abbildung), während die restliche Wurzel keine Färbung zeigte (Abb. 3.28 A). Die Promotoraktivität von *YUC9* hingegen war auch in ausgewachsenen Pflanzen in der kompletten Wurzel prominent (Abb. 3.28 B).
Die Analyse einzelner Wurzelbereiche zeigte für *YUC8* und *YUC9* eine Funktion bei der Seitenwurzelbildung. In Abbildung 3.29 sind die unterschiedlichen Entwicklungsstadien

Abb. 3.27 *(auf der nächsten Seite)*:
***YUC8*- und *YUC9*-Promotor-GUS-Reportergenanalysen während der Keimlingsentwicklung**
Dargestellt sind Keimlinge zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten von *YUC8*gus (A – H) und *YUC9*gus (I – P) nach GUS-Färbung (2.11). [Tage nach Aussaat: 1 (A und I), 2 (B und J), 3 (C und K), 5 (D und L), 6 (E und M), 7 (F und N), 12 (G und O), 14 (H und P); Maßstab 2 mm]


YUC8gus
YUC9gus
A
B
C
G
H
D
E
F
I
J
K
O
P
L
M
N

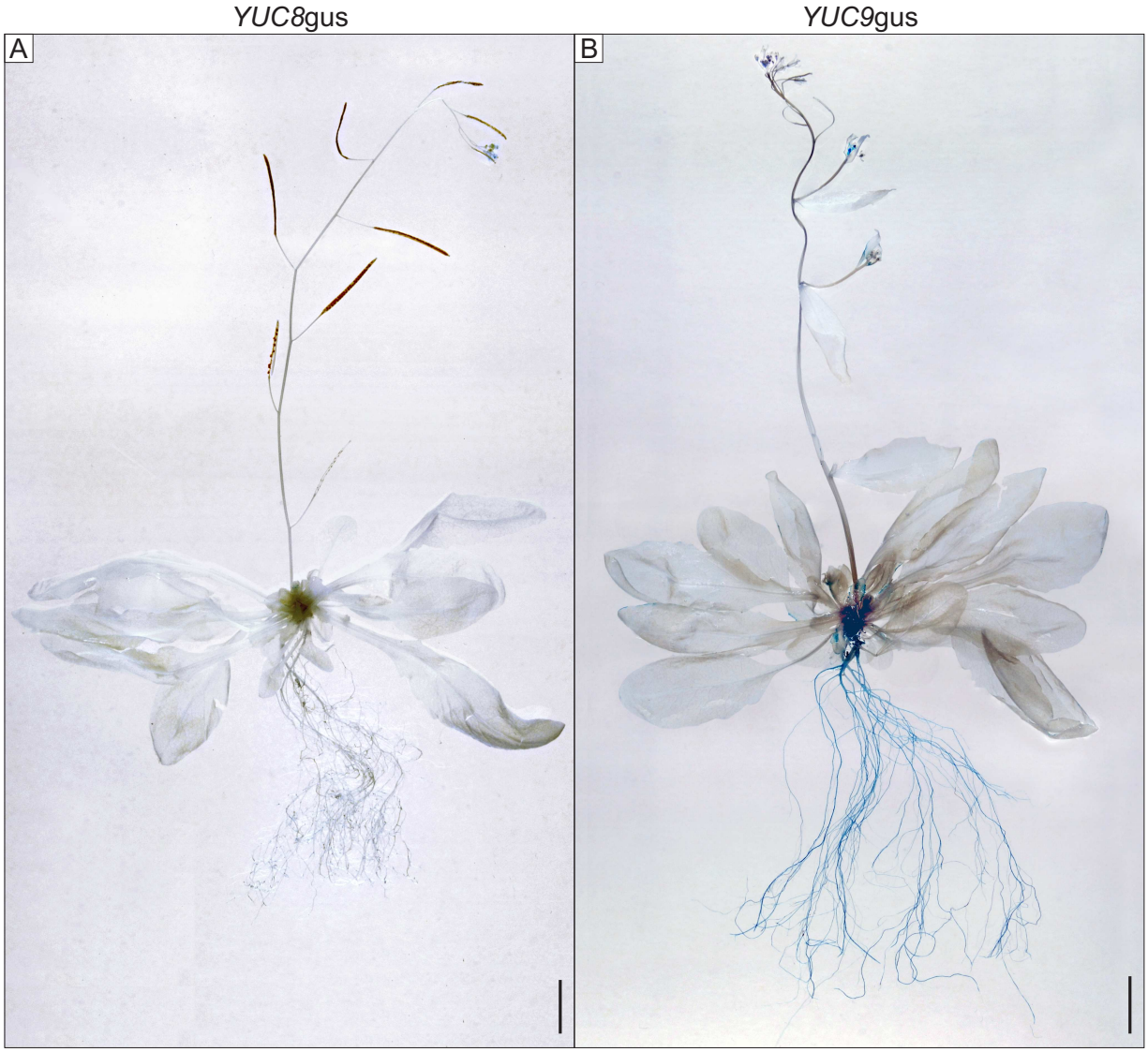


Abb. 3.28: Histochemische Färbung sechs Wochen alter *YUC8*gus- und *YUC9*gus-Promotor-Reportergenlinien
Nach sechswöchiger Anzucht (2.5.8) von *YUC8*gus (A) bzw. *YUC9*gus (B) unter Langtagbedingungen erfolgte die GUS-Färbung (2.11) und anschließend die Dokumentation der ganzen Pflanze (2.13). [Maßstab 1 cm]

bei der Anlage von Sekundärwurzeln für *YUC8*gus (A) und *YUC9*gus (B) dargestellt. Die *YUC8*-Promotoraktivität begann erst als die Seitenwurzel im Mikroskop gut erkennbar war und startete im Zentralzylinder der neu gebildeten Wurzel im Initiationsbereich. Mit fortschreitender Entwicklung stieg die Aktivität des Promotors an, blieb jedoch auf den Zentralzylinder der Sekundärwurzel und in späteren Stadien zusätzlich auf den Bereich der Initiationsstelle begrenzt. *YUC9*gus zeigte bereits mit Beginn der Seitenwurzelanlage eine höhere Aktivität im Zentralzylinder, welche in den weiteren Entwicklungsstadien ebenfalls bedeutend anstieg. Im Gegensatz zu *YUC8* war die Promotoraktivität von *YUC9* auf die Primärwurzel im Bereich der entstehenden Seitenwurzel beschränkt.

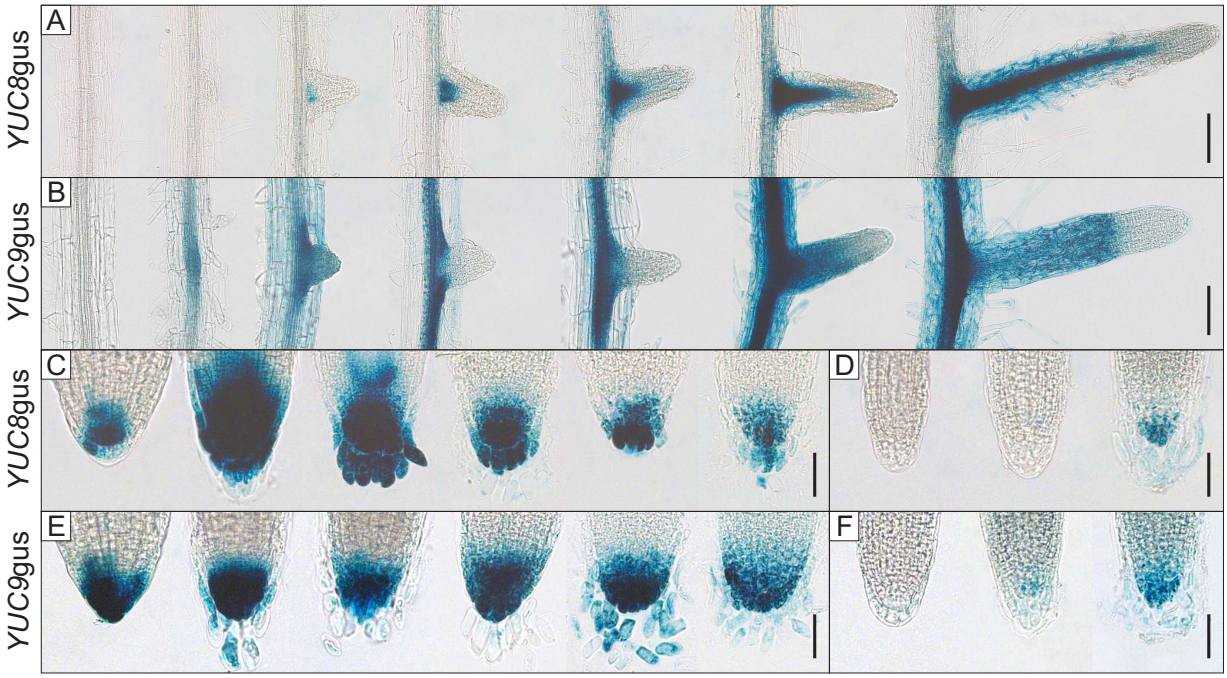


Abb. 3.29: Promotoraktivität von *YUC8* und *YUC9* in Wurzelspitzen und bei der Ausbildung von Seitenwurzeln
Gezeigt sind die Sekundärwurzelbildung (A und B) sowie die Primärwurzel- (C und E) und Sekundärwurzelspitzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (D und F) von *YUC8*gus- (A, C und D) und *YUC9*gus-Keimlingswurzeln (B, E und F) nach histochemischer GUS-Färbung. [Zeit nach Aussaat C und E: 1, 2, 4, 7, 10 und 14 Tage, D und F: 8, 12 und 14 Tage; Maßstab: A und B 100 µm, C – F 50 µm]

Die Primärwurzelspitzen von unterschiedlich alten Keimlingen zeigten eine frühe Promotoraktivität für *YUC8* und *YUC9* (Abb. 3.29 C und E). Bei *YUC8*gus war die *GUS*-Expression besonders im meristematischen Bereich und in der Columella zu finden, während sich die Aktivität bei *YUC9* hauptsächlich auf die meristematische Zone beschränkte. Die *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität nahm in den Primärwurzelspitzen

nach einem Maximum am zweiten Tag kontinuierlich ab, bis sie in 14 Tage alten Keimlingen zwar noch vorhanden, aber weniger intensiv war. Zudem ließ sich beobachten, dass sowohl bei *YUC8*gus als auch *YUC9*gus in jungen Sekundärwurzeln keine Aktivität in den Wurzelspitzen vorhanden war (Abb. 3.29 E und F). Hingegen stieg die Promotoraktivität in älteren Sekundärwurzelspitzen zeitgleich mit der Abnahme in den Primärwurzelspitzen an.

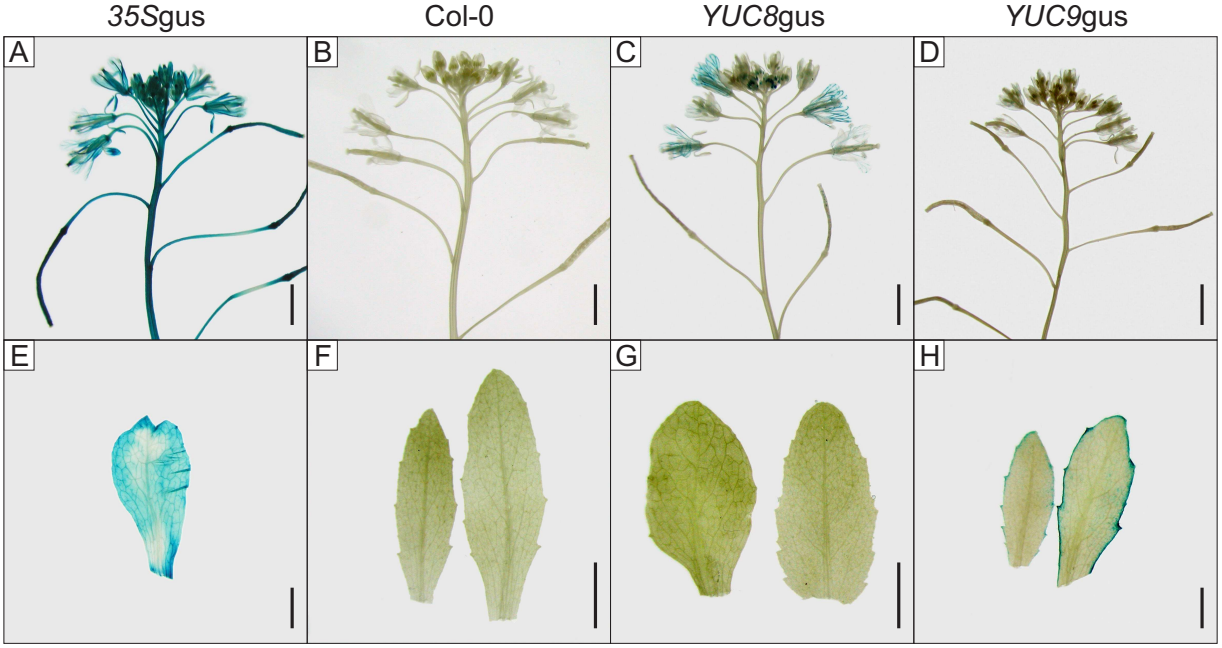


Abb. 3.30: Histochemische GUS-Analyse von Blütenstand und Blättern in verschiedenen Promotor-Reportergenlinien
Abgebildet sind die Blütenstände (A – D) und jüngere Blätter (E – H) sechs Wochen alter Pflanzen von *35S*gus als Positivkontrolle (A und E), Col-0 als Negativkontrolle (B und F), *YUC8*gus (C und G) und *YUC9*gus (D und H) nach GUS-Färbung (2.11). [Maßstab 2 mm]

Die GUS-Färbung von Blütenständen und Blättern ist in Abbildung 3.30 dargestellt. Neben *YUC8*gus (C und G) und *YUC9*gus (D und H) wurde als Positivkontrolle *35S*gus (A und E) verwendet (2.4.2). Dabei handelt es sich um eine transgene Linie, bei der es durch den viralen *35S*-Promotor zu einer konstitutiven *GUS*-Expression kommt. Col-0 (B und D) wurde als Negativkontrolle eingesetzt, um unspezifische Färbungen durch die verwendete Methode oder eine endogene GUS-Aktivität anzuzeigen [9]. Erwartungsgemäß zeigte *35S*gus in allen Geweben eine starke GUS-Aktivität, während Col-0 keine Färbung aufwies. Die Promotoraktivität war bei *YUC8*gus besonders in jungen Knospen und entwickelten Blüten zu sehen, während bei *YUC9*gus eine GUS-Aktivität in den Blatträndern zu verzeichnen war.

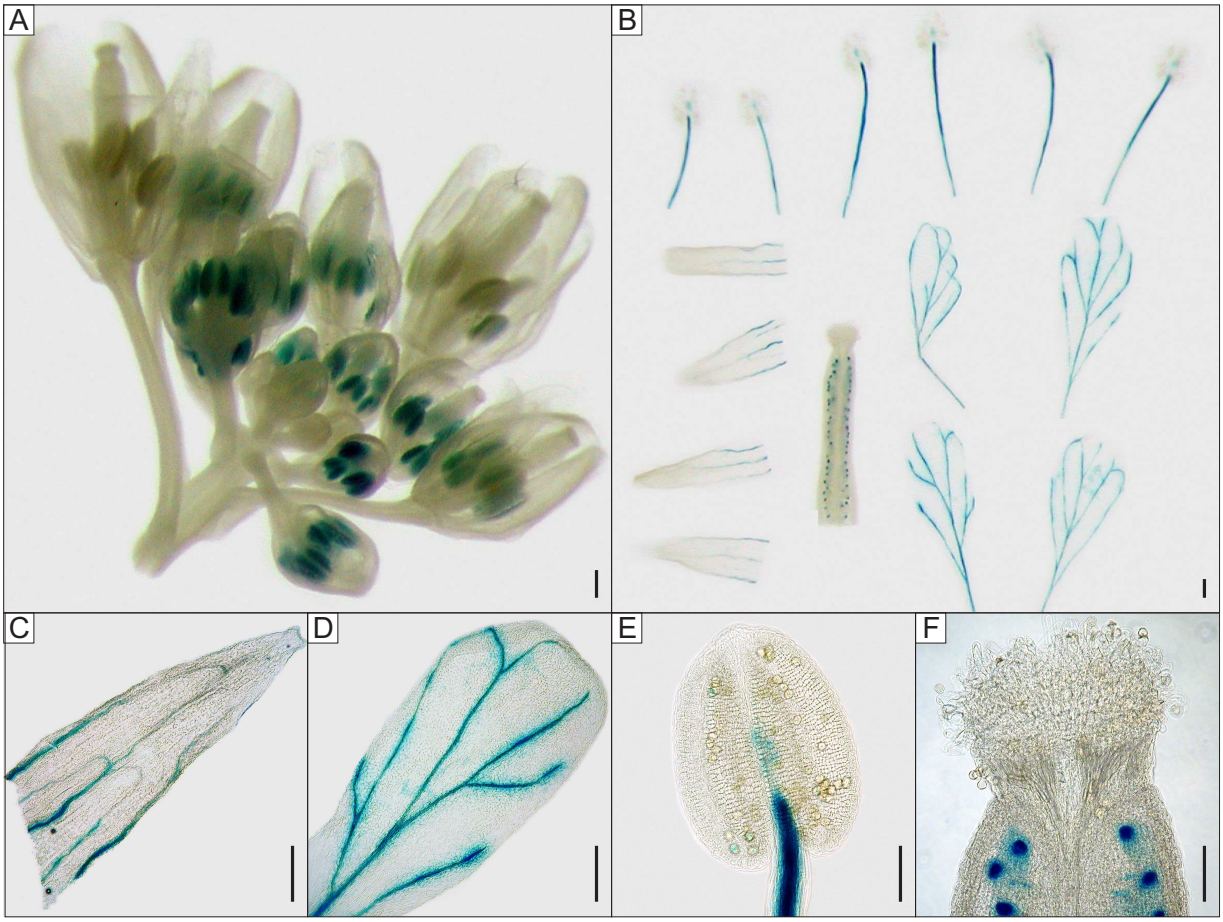
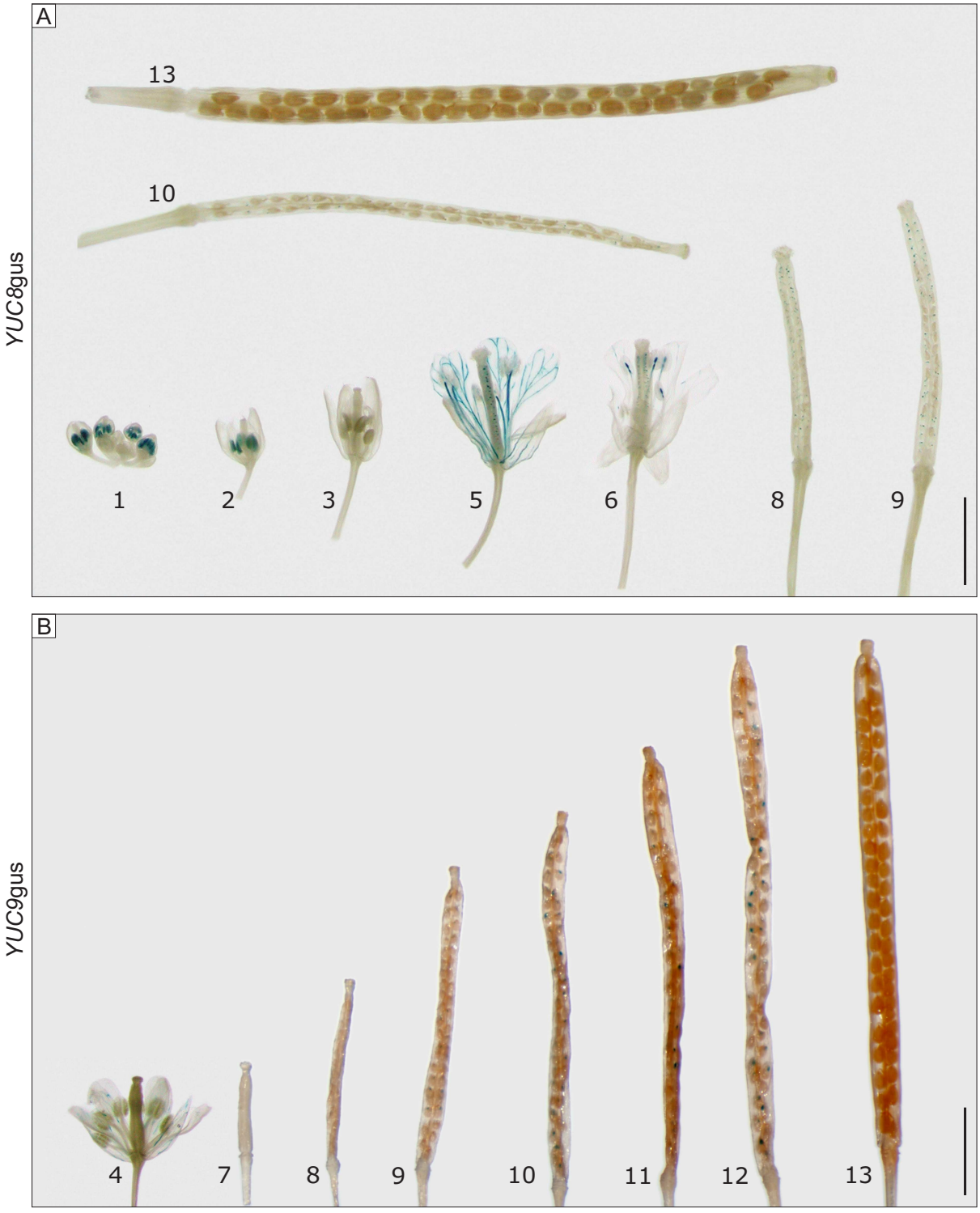


Abb. 3.31: *YUC8*-Promotoraktivität in Knospen und Blütenorganen
Zu sehen sind die Knospen und jungen Blüten (A) von *YUC8*gus sowie die Blütenorgane in der Übersicht (B) und jeweils ein Kelch- (C), Kron- (D), Staub- (E) und Fruchtblatt (F) nach histochemischer GUS-Färbung (2.11). [Maßstab 0,2 mm]

In Abbildung 3.31 A sind junge Blütenorgane von *YUC8*gus abgebildet. Die Aktivität des *YUC8*-Promotors stieg innerhalb junger Knospen in den sich entwickelnden Antheren an und sank in den älteren Knospen, kurz vor der Blütenentfaltung, wieder ab. Die Abbildung 3.31 B – F zeigt die einzelnen Organe einer Blüte zum Zeitpunkt höchster GUS-Aktivität während der Selbstbestäubung. In den Kelch- und Kronblättern (C und D) zeigte sich eine verstärkte GUS-Färbung in den Blattadern, wobei die Aktivität in den Kelchblättern bereits abnahm. Die Staubblätter wiesen im Gegensatz zu den jungen Knospen keine Promotoraktivität mehr in den Antheren, jedoch eine intensive Färbung in den Filamenten und geringfügig im Konnektiv (E) auf. Beim Fruchtblatt war eine deutliche *GUS*-Expression in den Eizellen zu erkennen (F).

Zur besseren Darstellung der Reproduktionsorgane sind ausgewählte Stadien von der Knospe über die Blüte bis hin zur Schote in Abbildung 3.32 zusammengefasst. Die Einordnung der einzelnen Entwicklungsstadien erfolgte dabei in 13 Schritte. Für *YUC8*gus (Abb. 3.32 A) zeigte sich eine starke Aktivität in den Antheren junger Knospen (1 und 2) und in jedem Blütenorgan während der Selbstbestäubung (5). Nach der Selbstbestäubung nahm die Promotoraktivität in der Blütenhülle massiv ab (6) und beschränkte sich auf die Zygote bzw. auf die sich entwickelnden Samen in den Schoten (8 und 9). In den wachsenden Schoten nahm die Aktivität ab (10) und kam schließlich ganz zum Erliegen (13). Eine Promotoraktivität in *YUC9*gus (Abb. 3.32 B) war in der Blütenentwicklung nahezu gar nicht vorhanden. Kurz vor Selbstbestäubung der Blüte (4), war kurzzeitig eine vereinzelte Aktivität in den Kronblättern zu verzeichnen. Erst mit fortschreitender Entwicklung begann die Promotoraktivität in den Schoten (9) mit teilweise starker Ausprägung in bestimmten Bereichen des sich entwickelnden Samens (10 – 12), bis sie schließlich ebenfalls nicht mehr detektierbar war (13).
Zur näheren Analyse der punktuellen Promotoraktivitäten in den reifenden Samen, wurden die entsprechenden Fruchtblätter bzw. Schoten unter dem Binokular präpariert und mikroskopisch untersucht (2.13). Die Abbildung 3.33 zeigt die einzelnen Reifestadien ab der befruchteten Eizelle von *YUC8*gus (A – C) und *YUC9*gus (D – F) in der entwicklungsspezifischen Reihenfolge. Kurz nach der Befruchtung stieg bei *YUC8*gus die Aktivität in Bereichen des Funiculus leicht und insbesondere im Nucellus stark an (A). Kurz darauf verlagerte sich die Promotoraktivität innerhalb des Funiculus und war ausgeprägt in den inneren Integumenten vertreten (B). Eine geringe GUS-Färbung war noch leicht im sichtbar werdenden Embryo zu erkennen (C). In *YUC9*gus war die Promotoraktivität besonders in dem sich entwickelnden Suspensor (D) und später zusätzlich auch im reifenden Embryo (E) sichtbar. Die Aktivität des *YUC8*-Promotors sowie des *YUC9*-Promotors verschwand komplett beim Übergang der Entwicklung des Embryos in das Herzstadium (F).

Abb. 3.32 *(auf der nächsten Seite)*:
Promotoraktivität von *YUC8* und *YUC9* während der Blüten- und Schotenentwicklung
Abgebildet sind ausgewählte Blüten und Schoten von *YUC8*gus (A) und *YUC9*gus (B) nach GUS-Färbung (2.11). Die Entwicklung von der Knospe bis zur reifen Schote wurde in 13 Entwicklungsschritte eingeteilt. Die *YUC8*-Promotoraktivität (A) war auf die Stadien 1, 2, 5, 6, 8, 9 und 10 begrenzt, während der *YUC9*-Promotor (B) in den Stadien 4, 9, 10, 11 und 12 aktiv war. In den anderen Entwicklungsstadien zeigte sich keine Promotoraktivität von *YUC8* bzw. *YUC9*. [Maßstab 2 mm]


A
YUC8gus
13
10
1
2
3
5
6
8
9
B
YUC9gus
4
7
8
9
10
11
12
13

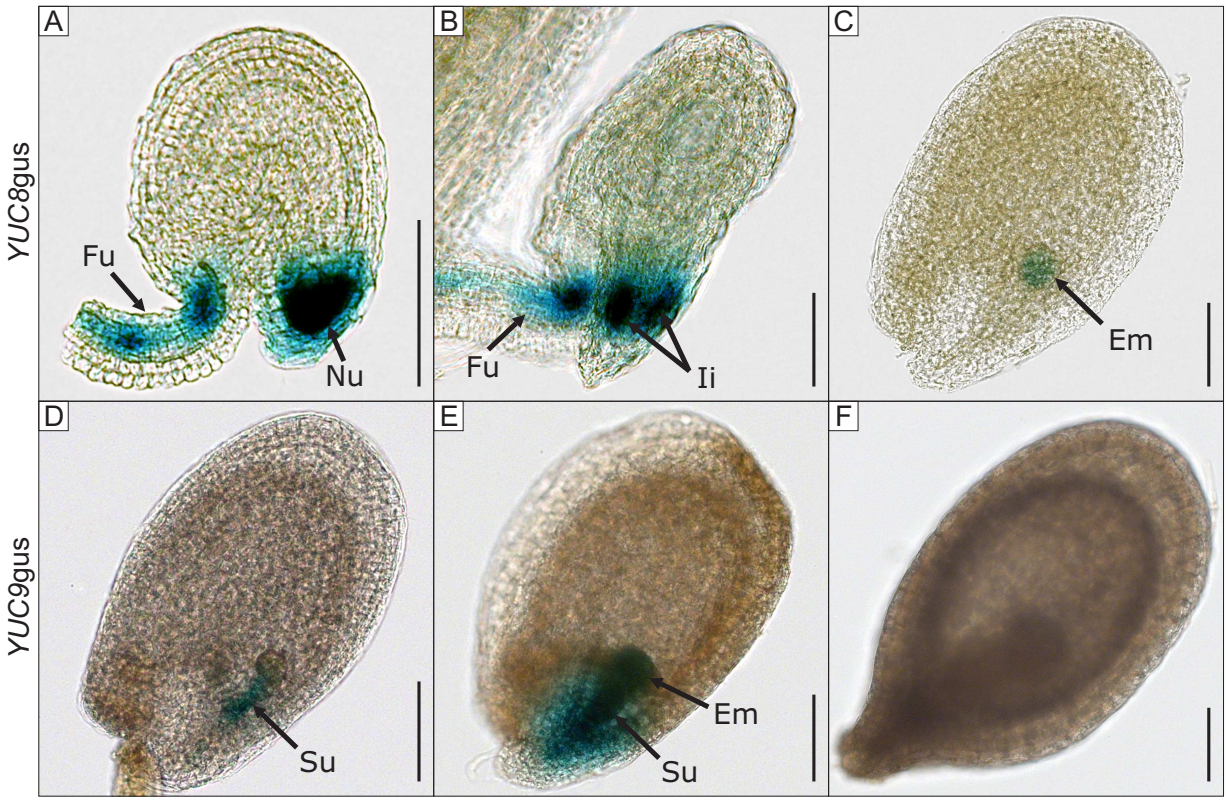


Abb. 3.33: Histochemische Analyse der *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität während der Samenentwicklung
Reifende Samen von *YUC8*gus (A – C) und *YUC9*gus (D – F) wurden präpariert und nach histochemischer Färbung dokumentiert (2.11, 2.13). Zeit nach Bestäubung: 12 h (A), 1 d (B), 2 d (C), 2 d (D), 3 d (E), 4 d (F). In F und den nachfolgenden, nicht aufgeführten Stadien war keine Promotoraktivität erkennbar. [Abkürzungen: Fu - Funiculus, Nu - Nucellus, Ii - innere Integumente, Em - Embryo, Su - Suspensor; Maßstab 100 µm]

3.9.3 Einfluss biotischer und abiotischer Faktoren auf die *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität

Neben den entwicklungs- und organspezifischen *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivitäten wurde der Einfluss biotischer und abiotischer Stimuli auf die Induzierbarkeit des *YUC8*- und *YUC9*-Promotors untersucht. Ziel war es herauszufinden, welche Bedingungen zu einer Induktion führen und in welchem Kontext die Ergebnisse mit der physiologischen Funktion stehen könnten. Im Zuge dieser Experimente sollte zudem überprüft werden, ob die Induktoren, welche einen erhöhten Transkriptgehalt bewirkten (3.2.3), ebenfalls zu einer verstärkten GUS-Aktivität in *YUC8*gus bzw. *YUC9*gus führen.

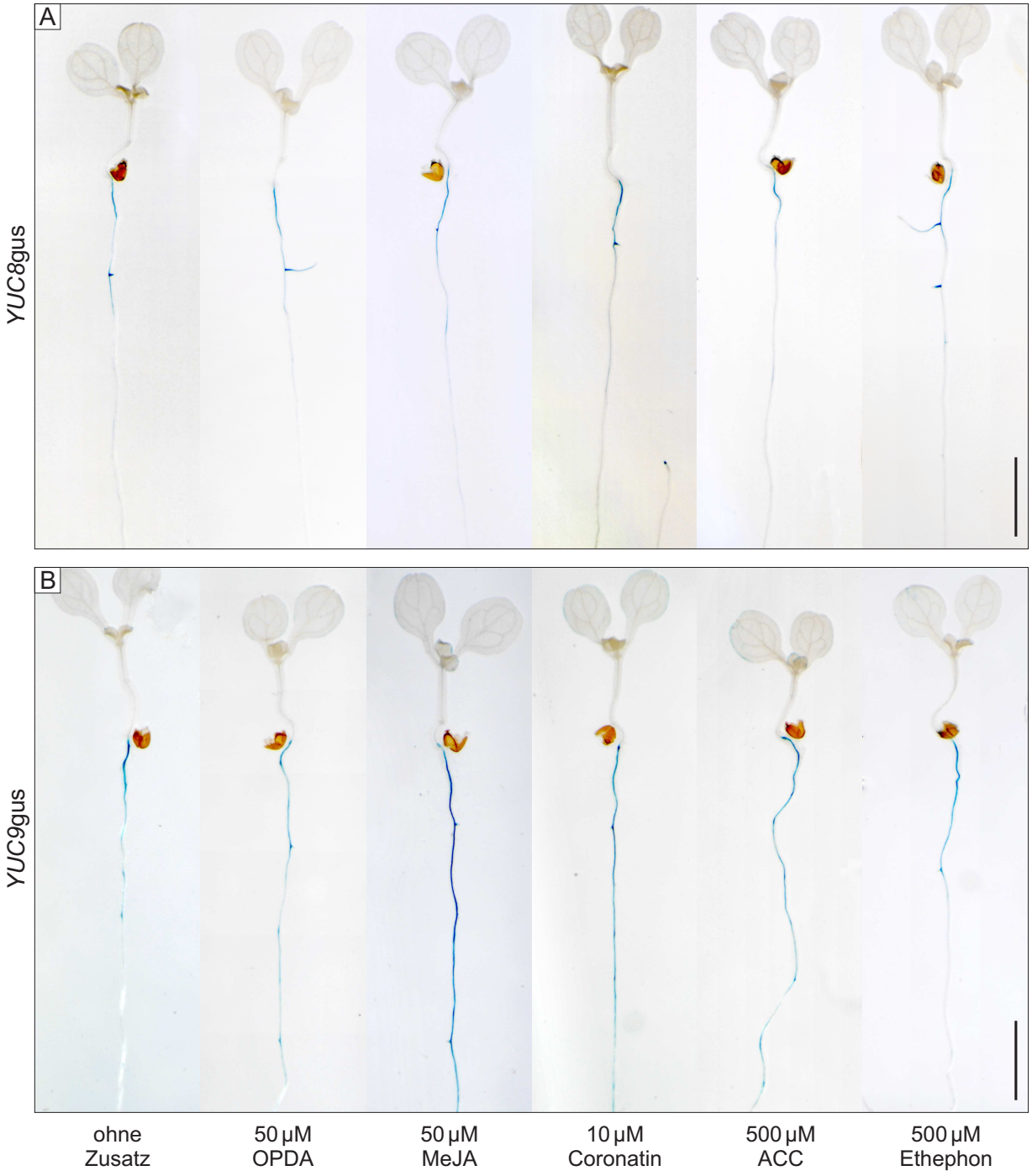


Abb. 3.34: Induktion der *YUC9*-Promotoraktivität nach Applikation verschiedener Zusätze
Dargestellt ist die histochemische Färbung (2.11) von sieben Tage alten *YUC8*gus- (A) und *YUC9*gus-Keimlingen (B) nach zweistündiger Behandlung mit verschiedenen Zusätzen. Dem Wuchsmedium temporär hinzugefügte Zusätze (2.5.13) und Konzentrationen sind in der Abbildung angegeben. [Maßstab 1 cm]

Für die Untersuchung der Promotoraktivität nach Induktion mit verschiedenen Zusätzen wurden sieben Tage alte *A.-thaliana*-Keimlinge behandelt (2.5.13) und die GUS-Aktivität nach zwei Stunden analysiert (2.11). In der Kontrolle ohne Zusatz ergab die GUS-Färbung für *YUC8*gus und *YUC9*gus eine basale Expression in den oberen Wurzeln und im Bereich sich neu bildender Seitenwurzeln (Abb. 3.34). Hinsichtlich der untersuchten Zusätze zeigte die *YUC8*-Promotoraktivität kaum Unterschiede (Abb. 3.34 A). Im Gegensatz dazu war für *YUC9* eine deutliche Induzierbarkeit des Promotors durch MeJA sowie Coronatin erkennbar (Abb. 3.34 B). Bei den mit OPDA-behandelten Keimlingen war im Vergleich zur Kontrolle lediglich eine schwächere GUS-Aktivität in den oberen und eine leicht gesteigerte *YUC9*-Promotoraktivität in den unteren Wurzelbereichen zu erkennen. Überdies zeigte insbesondere ACC und geringfügig Ethephon einen positiven Einfluss auf die *YUC9*-Promotoraktivität.

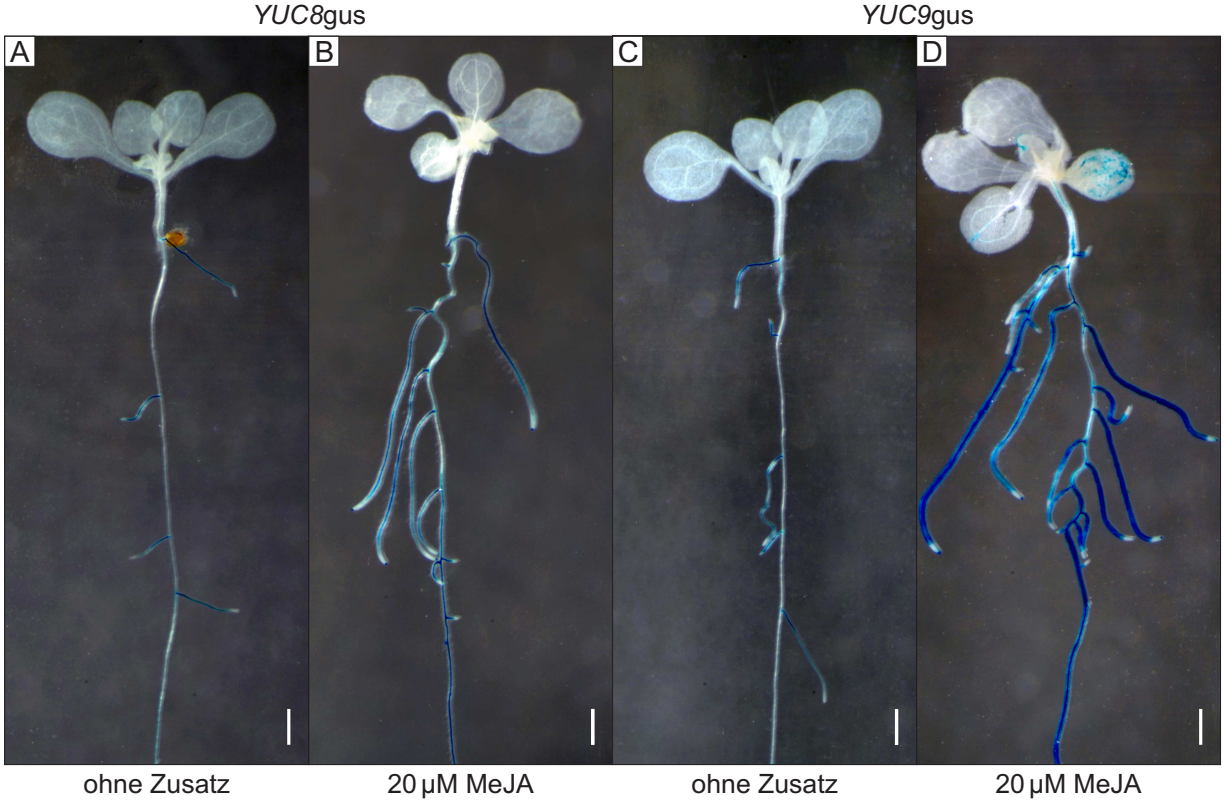


Abb. 3.35: Gesteigerte *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität durch Supplementation des Wuchsmediums mit MeJA
GUS-Färbung (2.11) zehn Tage alter Keimlinge von *YUC8*gus (A und B) und *YUC9*gus (C und D), welche auf ½MS-Medium (A und C) bzw. ½MS-Medium mit 20 µM MeJA angezogen wurden. [Maßstab 2 mm]

Zur Verstärkung der Induktionsbedingungen wurden *YUC8*gus und *YUC9*gus auf ½MS-Medien ohne bzw. mit 20 µM MeJA angezogen (2.5.8). Die histochemische GUS-Färbung erfolgte nach zehn Tagen Wachstum (2.11). Jeweils ein Keimling ist exemplarisch in Abbildung 3.35 dargestellt. Im Vergleich zum unsupplementierten Medium (A) war auf dem MeJA-haltigen Medium eine verstärkte *YUC8*-Promotoraktivität in den unteren Wurzelbereichen erkennbar (B). *YUC9*gus wies noch eine deutlich intensivere GUS-Aktivität auf MeJA-supplementiertem Medium (D) im Vergleich zur Kontrolle (C) auf.

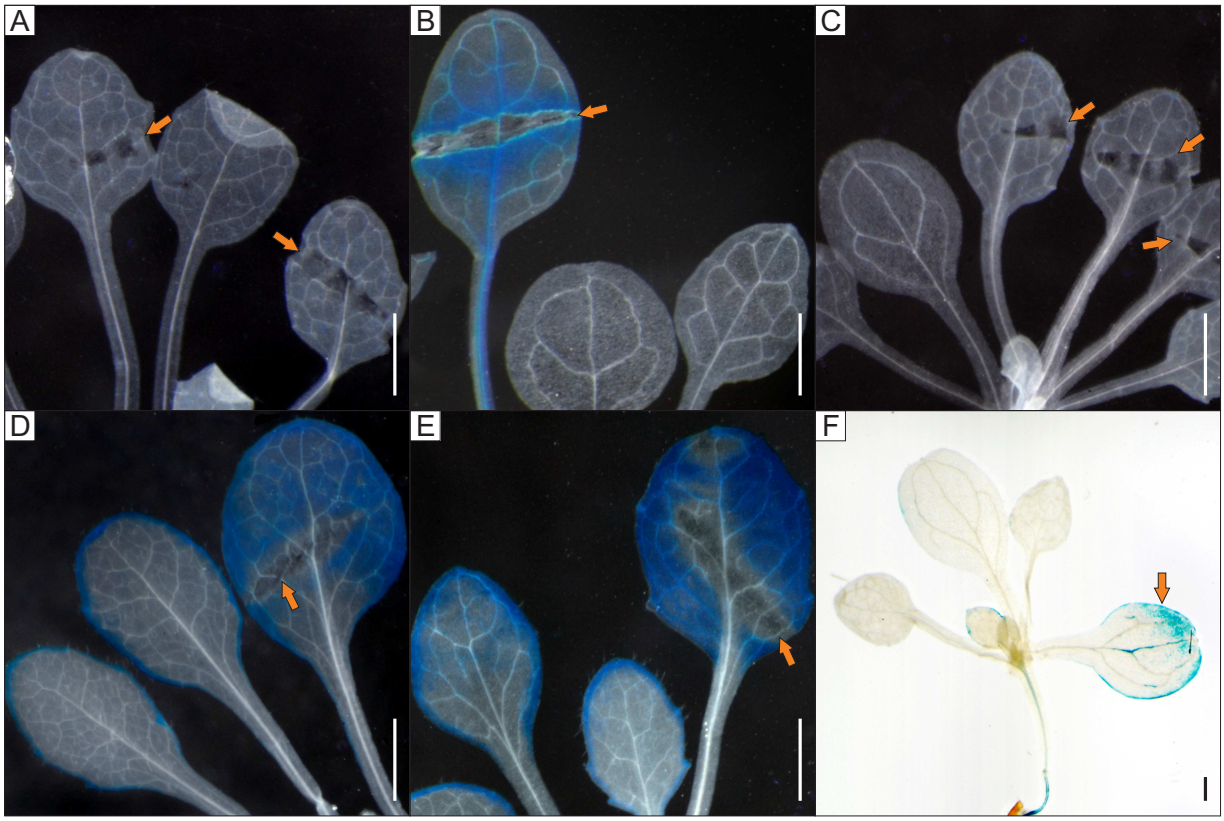


Abb. 3.36: Spezifische Induktion der *YUC9*-Promotoraktivität nach Verwundung
Drei Wochen alte Keimlinge wurden analog zu Abschnitt 2.5.13 mit einer Pinzette verwundet (Pfeile in A – E) und nach 12 h histochemisch gefärbt (2.11). Zu sehen sind Col-0 (A), *AOS*gus (B), *YUC8*gus (C) und *YUC9*gus (D – F). F zeigt die GUS-Färbung von *YUC9*gus 2 h nach Applikation von 10 µl 1 mM MeJA auf ein einzelnes Blatt (Pfeil). [Maßstab 2 mm]

Anhand der Induktionsstudien mit anschließender GUS-Färbung konnte gezeigt werden, dass sich insbesondere die verwendete Promotorregion von *YUC9* durch verschiedene Stoffe aktivieren lässt. Hier stellte sich die Frage, ob sich auch eine Aktivierung des Promotors unter physiologischen Bedingungen erreichen lässt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Verwundungsexperimente mit den Promotor-Reportergenlinien durch-

geführt (2.5.13) und die Gewebe nach zwei Stunden auf die spezifische GUS-Aktivität untersucht (2.11). Col-0 als Negativkontrolle sowie *YUC8*gus wiesen keine GUS-Färbung nach Verwundung auf (Pfeile in Abb. 3.36 A und C). Der durch Gewebeschädigung induzierte *AOS*-Promotor zeigte als Positivkontrolle (*AOS*gus; 2.4.2), dass die Verwundung ausreichte, um die spezifische Wundreaktion der Pflanze zu aktivieren (Abb. 3.36 B). So reagierte *YUC9*gus auf die verursachten Blattschäden mit einer Aktivierung des Promotors (Abb. 3.36 D und E), was auf einen verletzungsbedingten Anstieg von JA zurückzuführen ist. In Abbildung 3.36 F ist die spezifische Promotoraktivierung von *YUC9* bei einem einzelnen Keimlingsblatt zwei Stunden nach Gabe von 10 µl 1 mM MeJA (Pfeil) zu sehen.

4 Diskussion

Die Erde bietet eine limitierte Menge an natürlichen Ressourcen. Dabei schränkt vor allem die landwirtschaftlich nutzbare Fläche die maximale Population des Menschen ein. Dank der Mechanisierung der Landwirtschaft und des Einsatzes von Kunstdünger und Pflanzenschutzmitteln können mittlerweile mehr Menschen ernährt werden als je zuvor. Jedoch wird die Weltbevölkerung nach derzeitigen Prognosen von momentan 6,8 Milliarden auf eine Population von über 9,1 Milliarden Menschen im Jahr 2050 ansteigen [411]. Eine Lebensmittelverknappung scheint ebenso unausweichlich wie die daraus entstehenden Folgen einer Überbevölkerung. Mit Hilfe einer besseren Kenntnis über die Funktionsweise von Pflanzen kann zumindest der bevorstehenden Nahrungsmittelknappheit entgegengewirkt werden [261]. Dabei sind nachhaltige Anbaumethoden mindestens ebenso wichtig wie die kritische Auseinandersetzung mit gentechnisch modifizierten Nutzpflanzen [11, 303]. Gezielt genetisch veränderte Pflanzen können Vorteile bieten, wie z.B. mehr Ertrag oder eine optimale Anpassung an die entsprechenden Standortbedingungen. Sie beinhalten aber auch die Gefahren einer unkontrollierten Verbreitung, verbunden mit unvorhersehbaren Auswirkungen auf andere Ökosysteme [13, 250]. Nur mit einem deutlich besseren Verständnis der pflanzlichen Entwicklung, der individuellen Wachstumsprozesse sowie der pflanzenspezifischen Reaktionen auf wechselnde Umgebungsbedingungen können mögliche Nutzen und Gefahren analysiert werden. Mit den Vorteilen eines komplett sequenzierten Genoms hat sich die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.) innerhalb der pflanzlichen Grundlagenforschung als Modellorganismus der höheren Pflanzen etabliert [5, 239]. Die publizierten Forschungsergbnisse internationaler Arbeitsgruppen sind in öffentlichen *A.-thaliana*-Datenbanken zugänglich [45] und ermöglichen durch Homologievergleiche eine zielgerichtete Forschung an anderen Pflanzenspezies [30, 425]. Dabei ist in der Grundlagenforschung die Phytohormonforschung von besonderem Interesse, da diese Signalmoleküle nahezu alle pflanzlichen Entwicklungsprozesse steuern [143].
Für diese Arbeit von maßgeblicher Bedeutung waren die Phytohormongruppen der Octadecanoide und Auxine sowie Ethylen, welche jeweils ein breites Spektrum an spezifischen Stoffwechselwegen koordinieren [86]. Auxine mit ihrem Hauptvertreter, der Indol-3-essigsäure (IES), wirken insbesondere als Zellstreckungshormon. Zudem sind sie an Tropismen, der Zellteilung und nahezu allen anderen Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt. Octadecanoide, wie beispielsweise 12-Oxophytodiensäure (OPDA) und Jasmonsäure (JA), spielen vor allem eine Rolle bei der pflanzlichen Abwehr- und

Wundreaktion und sind unter anderem auch an der Blütenbildung und der Fruchtreife beteiligt. Das gasförmige Phytohormon Ethylen koordiniert überwiegend die Fruchtreifung und Lignifizierungs- bzw. Verholzungsprozesse.
Phytohormone reagieren jedoch nicht isoliert voneinander sondern ermöglichen durch kooperatives Verhalten eine gezielte Feinjustierung der pflanzlichen Entwicklung und die Anpassung an vorherrschende Umweltbedingungen. In den letzten Jahren mehrten sich die Erkenntnisse unterschiedlicher synergistischer und antagonistischer Wechselwirkungen [206, 439]. Die genauen Steuerungsmechanismen der verschiedenen Phytohormone untereinander sind bisher jedoch wenig erforscht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit charakterisieren erstmalig zwei Auxinbiosynthesegene, welche durch Octadecanoide induziert werden und deren Genprodukte zu einem gesteigerten Auxingehalt *in planta* führen sowie einen Einfluss auf Ethylen-vermittelte Prozesse ausüben und somit drei Phytohormonklassen miteinander verknüpfen.

4.1 Induktionsbedingungen der *YUC8*- und *YUC9*-Genexpression

Erste Hinweise auf eine direkte Verknüpfung der beiden Phytohormongruppen der Auxine und Octadecanoide erbrachten Gen-Chip-Studien („Microarrays“) mit der OPDA- und JA-defizienten *A. thaliana aos/opr3*-Doppel-Nullmutante, die eine differentielle Analyse JA- und OPDA-responsiver Gene ermöglichte [40]. Es zeigte sich neben der Effektorspezifischen Induktion unterschiedlicher Gene unter anderem eine Hochregulation auxinresponsiver Gene (Abb. 1.3). Zudem wiesen die Gen-Chip-Analysen in dieser Octadecanoid-behandelten Doppelmutante eine höhere Transkriptmenge an *YUC8* und besonders *YUC9* auf. Aufgrund ihrer Homologie zu bereits beschriebenen *YUC*-Genen liegt nahe, dass diese einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Auxinbiosynthese katalysieren (Abb. 1.1).
Seit Entdeckung der *YUC*-Genfamilie in *A. thaliana* im Jahr 2001 belegten mehrere Studien einen eindeutigen Zusammenhang zwischen *YUC* und dem IES-Gehalt *in planta* [57, 63, 65, 190, 237, 442, 457]. Die Überexpression *YUC*-homologer Gene in anderen Pflanzen führte auch dort zu typischen Auxin-Überproduktionsphänotypen [15, 18, 107, 124, 128, 402, 440, 447]. Die essentielle Bedeutung der *YUC*-Familie und deren redundantes Verhalten untereinander wird dadurch unterstrichen, dass im Fall von *A. thaliana* der Genverlust von mehr als acht der elf Mitglieder letal ist [458]. Zudem wurden *YUC*-Homologe in allen bisher sequenzierten Pflanzen identifiziert [161]. *In-silico*-Studien der *YUC*-Genfamilie in *A. thaliana* [167] zeigten für die Mitglieder jeweils spezifische und überlappende Expressionsmuster in unterschiedlichen Gewebebereichen und Ent-

wicklungsstadien. Dabei ist das Vorkommen überwiegend auf proliferierende Gewebe begrenzt [57, 63, 64, 65]. Die verschiedenen und überschneidenden Expressionsmuster weisen auf eine individuelle aber auch redundante Funktion der einzelnen *YUC*-Mitglieder in spezifischen Entwicklungsstadien und unter definierten Umweltbedingungen hin. Offenbar ermöglicht eine zielgerichtete lokale Auxinbiosynthese eine effiziente Steuerung pflanzlicher Entwicklungsprozesse. Auch zeigten die Datenbankanalysen, dass die Transkription einzelner *YUC*-Mitglieder durch exogenen Faktoren beeinflusst wird. Beispielsweise werden *YUC8* und *YUC9* durch veränderte Lichtqualitäten und bestimmte Stressfaktoren hochreguliert [94, 389]. Die molekularen Mechanismen der gezielten Induktion von *YUC*-Mitgliedern sind bisher jedoch noch nicht verstanden.
Einen ersten Hinweis zur Aufklärung dieser Mechanismen lieferte die Induktion von *YUC8* und *YUC9* in der Octadecanoid-behandelten *aos/opr3*-Mutante. Studien mit genetisch veränderten Pflanzen, bei denen gezielt bestimmte Genfunktionen inaktiviert wurden, stellen jedoch immer ein artifizielles System dar und spiegeln nicht zwingend die *In-vivo*-Situation wider. So kann es in der analysierten *aos/opr3*-Doppelmutante indirekt zur Veränderung weiterer Metabolite kommen. Beispielsweise wirkt JA selbst als positiver Regulator auf die eigene Biosynthese [428]. Dieser Rückkopplungsmechanismus führt zu einer raschen Verstärkung des JA-Signals und dementsprechend zu einer Erhöhung der JA-Vorstufen [334]. Durch die *aos*-Mutation in der Doppelmutante kann es daher nach Applikation von Methyljasmonsäure (MeJA) zu einer Akkumulation von 13-(S)-Hydroperoxylinolensäure (13-HPOT) kommen, da diese über die Allenoxidsynthase (AOS) nicht weiter zu 12,13-Epoxylinolensäure verstoffwechselt werden kann. Gesteigerte Mengen an 13-HPOT bewirken eine erhöhte enzymatische Umsetzung zu einer Vielzahl weiterer Octadecanoide. Bisher sind Reaktionswege von 13-HPOT zu Keto-, Divinylether-, Hydroxy-, Epoxyfettsäuren sowie Alkoholen, Aldehyden und Traumatin bekannt, welche wiederum spezifische Pflanzenreaktionen auslösen können (Abb. 1.2) [166, 416].
Insbesondere muss jedoch bedacht werden, dass es sich bei der Doppelmutante um einen Hybrid aus zwei unterschiedlichen Ökotypen handelt. Die *aos*-Mutation basiert auf *A. thaliana* var. Col-6 und die *opr3*-Mutation auf *A. thaliana* var. Ws. Die verschiedenen Ökotypen sind zwar untereinander kompatibel, doch weisen sie etwa 10 % spezifische Besonderheiten in ihrem Proteom auf [67]. Zudem reagieren sie Ökotyp-spezifisch verschieden auf abiotische und biotische Faktoren. So zeigen sich beispielsweise nach Gabe von Auxinen Ökotyp-abhängige Unterschiede bei der Wurzelentwicklung [191]. Die Octadecanoid-induzierte Expression von *YUC8* und *YUC9* in der *aos/opr3*-Nullmutante

lieferte somit zwar erste Hinweise über mögliche Regulationsmechanismen zwischen Octadecanoiden und Auxin, um jedoch Artefakte ausschließen zu können, waren Studien unter kontrollierten Bedingungen mit Wildtyppflanzen eines Ökotyps unter physiologischen Bedingungen obligat. Zur Schaffung konstanter Parameter wurden daher die Versuche an Wildtyppflanzen und Nullmutanten sowie die Erstellung mutierter Pflanzenlinien einheitlich im selben genomischen Hintergrund mit *A. thaliana* Col-0-Saatgut durchgeführt.
In vorangegangenen Arbeiten wurden zur näheren Untersuchung von *YUC8* und *YUC9* bereits semiquantitative RT-PCR-Analysen an Wildtyppflanzen durchgeführt [161]. Da bei dieser Art von Experimenten jedoch keine genauen Aussagen über die Transkriptgehalte getroffen werden können und sich die Studien aufgrund der geringen *YUC8*- und *YUC9*-Transkriptmengen bereits an der Nachweisgrenze befanden, wurden für neue Analysen methodische Veränderungen vorgenommen. Die Aufreinigung der Poly(A)$^+$-mRNA aus der Gesamt-RNA diente in erster Linie dazu, hohe Mengen an reiner, prozessierter mRNA zu gewinnen und andere zelluläre Komponenten sowie störende Nukleinsäuren zu entfernen. Zusätzlich wurden im Vorfeld die spezifischen Oligonukleotidpaar-Amplifikationseffizienzen bestimmt, um anschließend quantitative Transkriptmengenanalysen mittels „Real-Time"-PCR und statistischer Auswertung durchzuführen.
Mit diesen Studien war es möglich, *YUC8*- und *YUC9*-Transkripte unter standardisierten Bedingungen zu quantifizieren. Hierzu wurde der spezifische Transkriptgehalt von *YUC8* und *YUC9* in unterschiedlich alten Keimlingen und in verschiedenen Geweben von sechs Wochen alten *A. thaliana* Col-0 bestimmt (Abb. 3.4). Die Verteilung der Transkriptmengen weist auf eine Funktion in sich entwickelnden Keimlingen und besonders für *YUC9* auf eine Rolle im Wurzelgewebe hin. Weiterhin sollte die Analyse unterschiedlich alter Blätter Aufschluss über die Funktion in Stoffwechselprozessen geben. Während in jungen Blättern, als Nährstoff-verbrauchendes Gewebe („sink"), elementare Wachstumsprozesse maßgebend sind, dienen ältere Blätter durch ihre verstärkte Photosyntheseaktivität als Nährstoff-lieferndes Gewebe („source"). Es zeigte sich sowohl für *YUC8* als auch für *YUC9* relativ gesehen mehr Transkript in jungen Blättern. Zusammenfassend weist dies auf eine Funktion von *YUC8* und *YUC9* bei der Zellproliferation hin. Dies steht in Einklang mit der auf Homologiestudien basierenden Annahme, dass *YUC8* und *YUC9* an der Biosynthese von Auxinen beteiligt sind.
Induktionsstudien mit anschließender Transkriptquantifizierung sollten zeigen, ob sich *YUC8* und *YUC9* auch in Wildtyppflanzen durch Octadecanoide induzieren lassen.

Die in den Vorarbeiten erfolgten Gen-Chip-Analysen mit der *aos/opr3*-Doppelmutante wurden mit Blattmaterial von fünf Wochen alten Pflanzen durchgeführt [40]. Die gewebespezifischen Studien in dieser Arbeit zeigten für verschieden alte Blätter unterschiedliche *YUC8*- bzw. *YUC9*-Transkriptmengen (Abb. 3.4). Bereits geringe Unterschiede des Blattalters würden die Auswertung, bedingt durch die entwicklungsabhängigen Schwankungen, beeinflussen. Um diese Beeinflussung zu minimieren, wurden die Induktionsstudien daher mit sieben Tage alten Keimlingen durchgeführt. Bei der Analyse von ganzen Keimlingen muss bedacht werden, dass sich in wachsenden Keimlingen das Biomasse-Verhältnis von Wurzel und Blatt zugunsten der Blätter ändert und die Wurzel nur noch einen sehr geringen Einfluss auf den Gesamtanteil und damit die Transkriptmenge hätte. Daher wurde ein einheitliches Entwicklungsstadium von sieben Tagen alten Keimlingen gewählt.
Im Gegensatz zur Verwendung junger Keimlinge wäre eine erforderliche fünfwöchige Pflanzenanzucht zur Gewinnung von ausreichend Blattmaterial für die Studien dieser Arbeit weniger praktikabel. Nach zwei Wochen Wachstum auf sterilem Medium hätten die Pflanzen auf Erde pikiert werden müssen, um dort weitere drei Wochen bis zur Blatternte zu wachsen. Beim Pikieren kann die Wurzel kaum sichtbar beschädigt werden, so dass sich nachfolgende Verhaltensänderungen ergeben bzw. sich eine eingeschränkte Stresstoleranz entwickelt. Die Induktionsstudien mit Keimlingen erfolgten hingegen auf sterilem Wuchsmedium ohne Änderung der Umgebungsbedingungen wie z.B. Lage, Licht und Temperatur. Insbesondere die Vereinheitlichung der beiden letztgenannten Punkte waren für eine reproduzierbare Analyse von *YUC8* und *YUC9* zwingend erforderlich.
Knapp 90 % der *Arabidopsis*-Gene unterliegen bei wechselnden Temperaturen und Lichtbedingungen einer veränderten Transkriptionsintensität [244]. Da die Umgebungsbedingungen zwischen beleuchteten warmen Tagen und dunklen kühlen Nächten deutlich schwanken, haben sich Pflanzen durch Koordination ihrer physiologischen Prozesse zu bestimmten Tages- und Nachtzeiten daran angepasst. Zur Analyse dieser Anpassungen wurden von MOCKLER *et al.* „Multi-Array"-Analysen mit Gen-Chips durchgeführt und die unterschiedlichen Genregulationen in der Diurnal-Datenbank (2.15) zusammengefasst [253]. In Abbildung 4.1 ist der Einfluss ausgewählter Parameter auf die Regulation der Genexpression von *YUC8* und *YUC9* dargestellt. Während *YUC9* nur einen geringen Einfluss auf wechselnde Licht- und Temperaturbedingungen zeigt, wird *YUC8* durch diese Faktoren beeinflusst. Die Kurztag- und Langtagbedingungen zeigen deutlich circadiane Schwankungen, wobei die Expressionsintensität unter Licht zunimmt (Abb. 4.1 A,

oben). Die Dauerlichtversuche weisen eine starke Abhängigkeit von der Temperatur auf (Abb. 4.1 B, oben). Ebenso deutet die Analyse unter konstanter Dunkelheit auf eine Temperaturabhängigkeit hin (Abb. 4.1 C, oben). Kürzlich wurde von RAWAT *et al.* (2009) [310] anhand von Datenbankstudien eine circadiane Regulation von *YUC8* beschrieben. Die Autoren berücksichtigten jedoch nur die Kurztagbedingungen. Eine circadiane Rhythmik folgt einer Periodenlänge von meist 22 bis 25 Stunden, welche keine äußerlichen Reize benötigt [156, 390]. Die weitergehende Datenbankanalyse der Genexpression innerhalb der Dauerlicht- und Dunkelheitsversuche zeigte jedoch einen starken Einfluss der Temperatur, wobei eine niedrige Temperatur zu niedrigeren Transkriptgehalten führte. Die Regulation von *YUC8* wird demnach auch durch weitere Faktoren wie wechselnde Temperaturen beeinflusst. Um die äußeren Einflüsse auf die Genexpression der beiden *YUC*-Gene zu minimieren, erfolgte die Induktion bzw. Probennahme zur gleichen Uhrzeit sowie unter identischen Licht- und Temperaturbedingungen.
Neben den Versuchen mit Wildtyppflanzen erfolgten zusätzliche Transkriptanalysen mit den Nullmutanten *aos/opr3* und *coi1* [40, 116, 446]. Während die *aos/opr3*-Doppelmutante zur Verifikation der Gen-Chip-Analysen eingesetzt wurde, sollte *coi1* Aufschluss über mögliche Signaltransduktionswege geben. Für die Untersuchung der Octadecanoid-Induzierbarkeit von *YUC8* und *YUC9* wurden OPDA, MeJA und Coronatin als Induktoren eingesetzt. Der Methylester von JA, MeJA, wurde als leicht flüchtiger Stoff aus dem ätherischen Öl von *Jasminum grandiflorum* beschrieben [89]. JA ist ist insbesondere an der pflanzenspezifischen Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren beteiligt [48, 199]. Ein funktioneller Unterschied von MeJA gegenüber der freien Säure JA besteht dabei nicht [202, 386]. In den letzten Jahren wurden bedeutende Fortschritte in der Aufklärung des Jasmonsäure-Signalwegs gemacht. Biotische und abiotische Stressfaktoren verursachen einen Anstieg von JA [165, 200, 443]. Hohe Mengen an JA führen zur *De-novo*-Synthese von (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucin (JA-Ile) [119, 383], welches die physiologisch aktive Form von JA darstellt [120, 427]. Das strukturell und funktionell dem Auxinrezeptor TIR1 („transport inhibitor response 1“) [92, 185] verwandte Protein COI1 („coronatine-insensitive 1“) dient dabei als JA-Ile-Rezeptorkomponente [235, 448] und bewirkt eine TIR1-ähnliche Regulation [387]. Das F-Box-Protein COI1 ist Bestandteil des SCF^{COI1}-Komplexes [112, 407], welcher zur Polyubiquitinierung bestimmter Proteine und dadurch zum proteolytischen Abbau durch das 26S-Proteasom führt [377, 418]. Bei den proteolytischen Substraten handelt es sich um Repressoren JA-induzierbarer Gene, sogenannte JAZ-Proteine [69, 394]. Dabei dimerisieren die JAZ-Repressoren spezifisch an pflanzlichen MYC-Proteinen und unterbinden die Genexpression [68, 367],

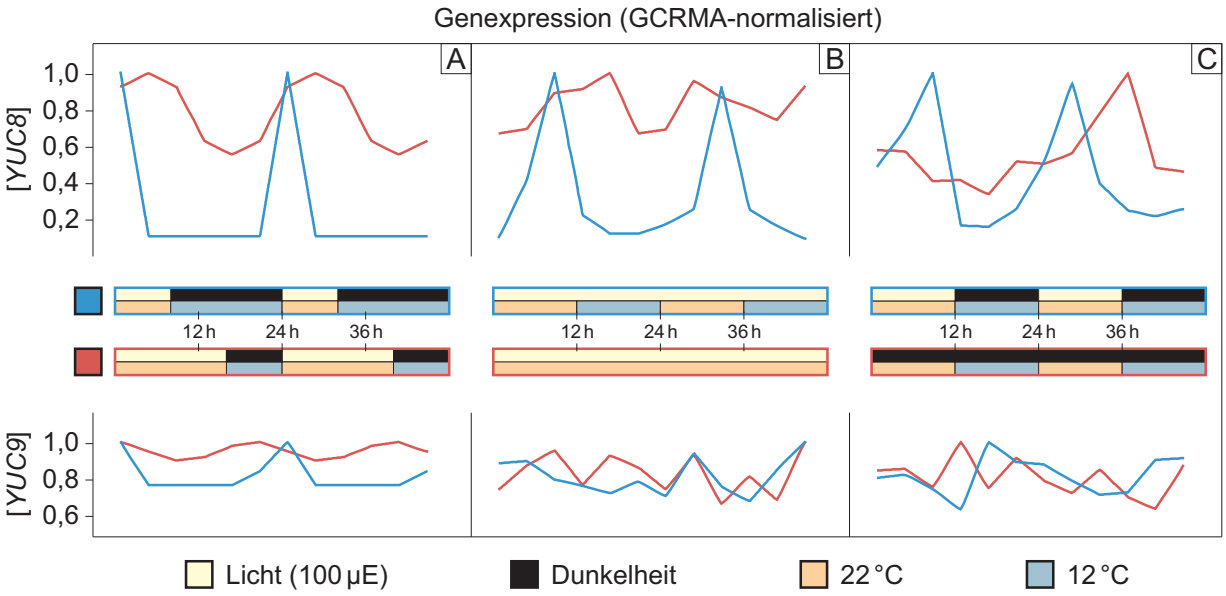


Abb. 4.1: Abhängigkeit der *YUC8*- und *YUC9*-Transkription von Licht, Temperatur und circadianem Rhythmus
Dargestellt sind Diurnal-Datenbank-Analysen (2.15) zur transkriptionellen Regulation von *YUC8* (oben) und *YUC9* (unten) unter wechselnden Licht- und Temperaturbedingungen. Ausgewählte Parameter sind Kurztagbedingungen (A, blau), Langtagbedingungen (A, rot), Dauerlichtversuche mit wechselnder Temperatur (B, blau) und konstanter Temperatur (B, rot) sowie identische Licht- und Temperaturzyklen (C, blau) im Vergleich zu wechselnden Temperaturen bei konstanter Dunkelheit (C, rot). Die Länge der mittleren Balken entspricht den Versuchszeiträumen von 8 h, 12 h, 16 h bzw. 48 h, wobei die Lichtperiode (hellgelb) und Dunkelperiode (schwarz) sowie die Temperaturen von 22 °C (hellorange) und 12 °C (hellblau) gekennzeichnet sind. Die Probennahme erfolgte alle vier Stunden. Die veränderten Transkriptgehalte sind GCRMA-normalisiert („gene chip robust multiarray average“) dargestellt [445].

da die MYC-Transkriptionsfaktoren nicht mehr aktivierend an den *cis*-Elementen JA-responsiver Elemente wirken können [96, 240]. Durch den JA-Ile-vermittelten Abbau von reprimierenden JAZ-Faktoren über den SCF^{COI1}-Komplex können die entsprechenden Gene transkribiert werden, wodurch es zur spezifischen JA-Signalantwort kommt [48, 70]. In der Nullmutante *coi1* kann die spezifische Rezeptorkomponente COI1 nicht mehr synthetisiert werden [116]. Infolgedessen werden weder JA-Ile noch Coronatin perzipiert [180], wodurch die Expression JA-responsiver Gene und somit die JA-Signalantwort ausbleibt. Die physiologisch aktive Substanz OPDA ist eine Vorstufe von JA (Abb. 1.2) und gilt als eigenständiger Signalstoff in der Mechanotransduktion und Wundantwort [41, 386], welcher die Genexpression über einen COI1-unabhängigen Signalweg induzieren kann [376]. Mit der *coi1*-Mutante sollte analysiert werden, ob die Induktion durch Octadecanoide über den COI1-abhängigen Signalweg verläuft

oder COI1-unabhängig ist. Die Perzeptionsmechanismen für einen COI1-unabhängigen Weg durch OPDA sind allerdings noch ungeklärt. Bei dem Phytotoxin Coronatin handelt es sich um ein Polyketid-Aminosäurederivat des pflanzenpathogenen Bakteriums *Pseudomonas syringae* [22, 249]. Coronatin ist als Virulenzfaktor entscheidend am Krankheitsverlauf beteiligt und induziert die Expression spezifischer Gene [23, 425]. So wirkt der Stoff seneszenzfördernd [114], verursacht eine Rankenkrümmung bei *Bryonia dioica* [433], inhibiert das Wurzelwachstum bei *A. thaliana* [116] und induziert neben Auxin die Produktion weiterer Phytohormone [412]. Aufgrund der gemeinsamen Wirkspektren und der strukturellen Ähnlichkeit wird Coronatin als funktionelles Analogon zu JA-Ile angesehen [48].
Nach Behandlung von sieben Tage alten *A. thaliana* Col-0-Keimlingen mit OPDA, MeJA bzw. Coronatin wurden die *YUC8*- und *YUC9*-Transkriptveränderungen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert (Abb. 3.5 C und D). Die Transkriptanalysen mit den Nullmutanten erfolgten zu einem singulären Zeitpunkt zwei Stunden nach Induktion mit den gleichen Substanzen (Abb. 3.5 A und B). *YUC8* zeigte in den Wildtypanalysen zu Beginn eine geringere Transkriptrate, welche sich nach vier Stunden wieder normalisierte. Auch *coi1* wies nach Behandlung mit den Induktoren eine wie im Wildtyp verminderte Transkriptrate von *YUC8* auf. Denkbar wäre eine Anpassung der Expression über einen COI1-unabhängigen Signalweg [319, 399]. Im Gegensatz zu *YUC8* wird *YUC9* in Col-0 stark durch MeJA (15-fach) und Coronatin (12-fach) induziert. Die OPDA-Induktion ist mit einer Verdopplung der Transkripte geringfügig höher als in den Kontrollen. Die Versuche mit *coi1* zeigten keine Veränderung des *YUC9*-Transkripts nach MeJA- und Coronatin-Behandlung, hingegen eine Verminderung nach OPDA-Behandlung. Mit Bezug auf die Wildtypversuche lässt sich festhalten, dass die *YUC9*-Expression durch MeJA und Coronatin über den COI1-Signalweg induziert wird. Die lediglich schwache Aktivierung durch OPDA im Wildtyp und die Repression in *coi1* deutet wie bei *YUC8* zusätzlich auf einen COI1-unabhängigen Mechanismus hin. Denkbar wäre ein antagonistischer Einfluss von OPDA auf die *YUC9*-Transkription über einen COI1-unabhängigen Mechanismus, wodurch die verminderte Transkription in der OPDA-behandelten *coi1*-Mutante erklärt werden kann. OPDA wird *in planta* auch zu JA metabolisiert. Im Gegensatz zu *coi1* kann JA in Wildtyppflanzen die COI1-abhängige Genexpression aktivieren. Durch den reprimierenden Einfluss von OPDA und die gleichzeitige Induktion von aus OPDA synthetisierter JA, kann die geringe Transkriptsteigerung in Wildtyppflanzen erklärt werden. Zur Verifikation dieser Hypothese wären Studien mit einer *opr3*-Nullmutante im Col-0-Hintergrund nötig.

Da OPDA dort nicht zu JA metabolisiert werden kann, wäre in OPDA-behandelten *opr3*-Mutanten eine deutliche Repression der *YUC9*-Genexpression zu erwarten. Die Transkriptstudien mit der in dieser Arbeit verwendeten *aos/opr3*-Mutante können aufgrund des anderen Hintergrunds (Col-6/Ws) nicht als direkter Vergleich mit *coi1* und Col-0-Wildtyppflanzen verwendet werden. Insgesamt belegten die Versuche sowohl für *YUC8* als auch für *YUC9* eine Beeinflussung durch die Induktoren, wobei *YUC9* COI1-abhängig besonders durch MeJA und Coronatin induziert wird.
Die durchgeführten Transkriptanalysen zeigten unterschiedliche mRNA-Gehalte in Bezug auf das Entwicklungsstadium und verschiedenen Induktionsbedingungen auf (3.2.2; 3.2.3). Da die mRNA jedoch noch vor der Translation in verschiedenen Geweben unterschiedlich schnell abgebaut werden kann bzw. die Proteine posttranslational modifiziert oder differentiell inaktiviert werden können, ist eine Aussage über den tatsächlichen Proteingehalt nur bedingt möglich. Mit Hilfe der erstellten *YUC8*gus- bzw. *YUC9*gus-Linien konnten die Transkriptstudien über das Induktionsverhalten von *YUC8* bzw. *YUC9* auf Promotorebene verifiziert werden. Hierfür wurden Keimlinge der Promotor-Reportergenlinien analog zu den Transkriptanalysen mit Octadecanoiden und weiteren möglichen Induktoren behandelt und auf ihre spezifische Promotoraktivität analysiert (3.9.3). Während sich für *YUC8*gus keine signifikanten Änderungen aufzeigten, ließ sich der Promotor von *YUC9* spezifisch aktivieren (Abb. 3.34). Dabei bestätigten die Studien die Transkriptanalysen mit einer leichten *YUC9*-Induktion durch OPDA sowie einer starken Aktivierung durch MeJA und Coronatin.
Verwundungsstudien mit den Promotor-Reportergenlinien (Abb. 3.36) zeigten, dass *YUC9* auch unter physiologischen Bedingungen durch Octadecanoide induziert wird. Während die Verletzung von Blattgewebe keinen Einfluss auf *YUC8*gus verursachte, stieg die *YUC9*-Promotoraktivität deutlich an. Es ist bekannt, dass pflanzliche Stressantworten, wie z.B. die Verwundungsreaktion, von einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Phytohormone gesteuert werden und vor allem zu einem Anstieg von Octadecanoiden führen [17, 97]. Bei der pflanzlichen Wundreaktion wird versucht die entstandenen Schäden so gering wie möglich zu halten. Auf der einen Seite geschieht das durch Apoptose [144] oder durch Wundverschluss infolge kontrollierter Zellproliferation [76, 301]. Die Zellproliferation wird dabei unter anderem durch Auxin realisiert [54, 55]. Der stressbedingte Anstieg von JA könnte dabei in der pflanzlichen Wundreaktion *YUC9* induzieren und dadurch die Auxinhomöostase beeinflussen.
Neben den Regulationsmechanismen von *YUC8* und *YUC9* ist es für das Gesamtverständnis, und zur Aufklärung möglicher redundanter Effekte erforderlich zu erfahren,

wie die anderen neun *YUC*-Mitglieder reguliert werden. Hierfür wurden für Transkriptanalysen spezifische Oligonukleotidpaare für *YUC1 – YUC7* sowie *YUC10* und *YUC11* erstellt und mit den Untersuchungen begonnen. Von SUN *et al.* wurde 2009 in einem Nebenversuch gezeigt, dass sich die *YUC2*-Expression nach MeJA-Behandlung verdoppelt [382]. In den Studien der vorliegenden Arbeit zeigte sich für *YUC2* jedoch kein Induktionseffekt durch verschiedene biotische und abiotische Faktoren, sondern eher eine konstante Expressionsstärke unter den wechselnden Einflüssen (Abb. 3.18). Auch für die anderen *YUC*-Gene konnte kein Einfluss von Octadecanoiden auf die Transkriptmenge gezeigt werden. Es müssen jedoch die unterschiedlichen Versuchsdurchführungen bedacht werden. So wurden von SUN *et al.* zwölf Tage alte Keimlinge für drei Stunden induziert [382], während für die Versuche in dieser Arbeit sieben Tage alte Keimlinge nach zwei Stunden Induktion aufgearbeitet wurden. Im Vergleich zur 15-fachen Induktion von *YUC9* ist die publizierte zweifache Steigerung von *YUC2* jedoch relativ gering. Quantitative Analysen unter einheitlichen Bedingungen im direkten Vergleich würden eine eindeutige Aussage ermöglichen.

4.2 Subzelluläre Lokalisation und proteinbiochemische Analysen von YUC8- und YUC9-Fusionsproteinen

Mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden sollten Erkenntnisse bezüglich der subzellulären Lokalisation von YUC8 und YUC9 *in vivo* gewonnen werden, um damit Rückschlüsse auf den Wirkort innerhalb der Zelle zu ermöglichen. Die Kenntnis des Wirkorts hilft dabei, die physiologischen sowie die enzymatischen Eigenschaften auf das entsprechende Organell bzw. den Zellbereich einzugrenzen. Zwar wurden bereits Lokalisationsstudien mit YUC6:GFP in *A.-thaliana*-Protoplasten durchgeführt, jedoch zeigten die Fluoreszenzanalysen nicht definierbare, unterschiedlich große Aggregationen im Cytoplasma [190]. Co-Lokalisationsstudien mit organellenspezifischen Markerproteinen schlossen ein Vorkommen von YUC6:GFP in Chloroplasten, Mitochondrien, Peroxisomen sowie im Golgi-Apparat und endoplasmatischen Retikulum aus. Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von YUC8 und YUC9 wurden N- und C-terminale Fusionskonstrukte mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) unter Kontrolle eines *35S*-Promotors zur transienten Expression in die Blätter von *A. thaliana* und *N. tabacum* eingebracht und detektiert (3.8). Es sei erwähnt, dass es sich bei den verwendeten GFP-Konstrukten nicht um die originale GFP-Sequenz aus der biolumineszierenden Qualle

Aequoria victoria handelte [58]. Vielmehr wurden EGFP-Konstrukte („enhanced“ GFP) verwendet, welche für eine pflanzliche Expression optimiert wurden [449].
Abbildung 3.26 zeigt eine exklusiv cytoplasmatische Lokalisation der YUC8- und YUC9-GFP-Fusionsproteine, wobei im Unterschied zur cytoplasmatischen GFP-Kontrolle der Zellkern keine GFP-Fluoreszenz aufweist. Anhand der Chlorophyll-Autofluoreszenz sowie durch Vergleiche mit Hilfe von Lokalisationsstudien von anderen Organellen (ohne Abbildung) kann ein Import von YUC8 bzw. YUC9 in Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen ausgeschlossen werden. Die Fluoreszenzanalysen mit *N. tabacum* bestätigten die cytoplasmatische Lokalisation von YUC8 und YUC9 auch in artfremden Pflanzenspezies (ohne Abbildung). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien von GFP-markierten YUC8- und YUC9-Proteinen zeigen damit die ersten eindeutig lokalisierten YUC-Proteine *in planta*. Aufgrund der angenommenen enzymatischen Aktivität der YUC-Proteine (Abb. 1.1) bestand bereits die Hypothese einer cytoplasmatischen Lokalisation [75]. So sind die TDC-Proteine (Tryptophan-Decarboxylasen), welche das theoretische Substrat TAM (Tryptamin) für YUC bereitstellen, in anderen Pflanzen ebenfalls im Cytoplasma lokalisiert [233, 373]. Eine cytoplasmatische Detektion wurde ebenso für das möglicherweise nachfolgende Auxinbiosynthese-Protein AMI1 beschrieben [298].
Obwohl die *YUC*-Genfamilie einen elementaren Bestandteil im Auxinhaushalt der Pflanze darstellt [457], erfolgte bislang keine zufriedenstellende enzymatische Charakterisierung. Es ist lediglich bekannt, dass hohe Mengen an rekombinanten YUC1:MBP- und MBP:YUC6-Fusionsproteinen die *In-vitro*-Reaktion von TAM zu *N*-Hydroxytryptamin katalysieren [190, 455] (Abb. 1.1). Für eine Charakterisierung der Substratspezifität von YUC8 und YUC9 wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Strategien für eine erfolgreiche Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine verfolgt.
Unabhängig von der phylogenetischen Nähe des Proteins zum Expressionswirt wurde zunächst die heterologe Expression in *Escherichia coli* bevorzugt. Die Vorteile sind die einfache Handhabung, das schnelle Wachstum, die Verfügbarkeit, sowie die kostengünstige Verfahrensweise. Eine allgemein verwendete Strategie, die Löslichkeit zu erhöhen, bietet die Fusion an ein anderes Protein, welches für eine hohe Löslichkeit bekannt ist. In Vorarbeiten zeigte sich ein eingeschränktes Löslichkeitsverhalten von YUC8-Fusionsproteinen [161]. Daher erfolgte die Herstellung N-terminaler MBP-Fusionsproteine in *E. coli* durch Fusion von *YUC8* und *YUC9* mit dem *malE*-Gen, welches für das stark hydrophile, etwa 43 kDa große Maltosebindeprotein (MBP) [21] codiert (Abb. 6.1). Neben einer cytoplasmatischen Expression in *E. coli* wurde auch ein MBP-System verwendet, bei dem eine

N-terminale Signalsequenz zum Export in das Periplasma führt, um eine Aufreinigung aus dem Medium zu ermöglichen [19, 99]. Mittels einer integrierten Proteaseschnittstelle bestand zudem die Möglichkeit, überexprimierte Fusionsproteine vom MBP-Protein enzymatisch zu trennen, um so einen möglichen Einfluss des Affinitätsanhangs ausschließen zu können [176, 314].
Eine erfolgreiche Überexpression und Aufreinigung von MBP:YUC8 und MBP:YUC9 konnte nur mit einer cytoplasmatischen Expression erreicht werden (Abb. 3.1). Hier zeigte sich zudem eine leichte Gelbfärbung der Elutionsfrakionen, welches als Indiz für einen erhöhten Flavin-Anteil gewertet werden könnte. Flavin bildet als prosthetische Gruppe einen integralen Bestandteil der YUC-Flavin-Monooxygenasen, der für eine enzymatische Funktion obligat ist [56, 105]. Zur Überprüfung des Flavin-Gehalts wurden die aufgereinigten Proteinfraktionen photometrisch analysiert. Im Gegensatz zur Flavin-Kontrolle fehlten jedoch bei den Elutionsfraktionen die typischen Flavin-Maxima bei 373 und 444 nm (Abb. 3.2). Dies deutet darauf hin, dass mittels des MBP-Anhangs zwar eine lösliche Überexpression erreicht wurde, eine korrekte Inkorporation von Flavin hingegen nicht erfolgt war. Auch konnte in Studien mit YUC1-Fusionsproteinen ebenfalls kein Einbau von Flavin nachgewiesen werden [296].
Aktivitätsstudien sollten Hinweise zur Aktivität und Substratspezifität der überexprimierten MBP:YUC8- bzw. MBP:YUC9-Proteinfraktionen liefern (3.1.4). Zur Bestimmung der enzymatischen Funktion wurden Intermediate aus der Auxinbiosynthese (Abb. 1.1) und weitere mögliche Substrate sowie Cofaktoren bereits beschriebener Flavin-Monooxygenasen eingesetzt [6, 204]. Es konnte weder photometrisch noch mittels dünnschichtchromatographischer Analysen eine Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.3). Auch die für MBP:YUC1 und YUC6:MBP beschriebene Vorgehensweise zur *In-vitro*-Umsetzung von TAM [190, 455] führten zu keiner messbaren enzymatischen Aktivität von MBP:YUC8 und MBP:YUC9. Denkbar wäre, dass TAM nicht das bevorzugte Substrat der YUC-Proteine ist. So wurden im Vergleich zu anderen Aktivitätsmessungen in den Studien zu YUC1 und YUC6 über einhundertfach erhöhte Proteinmengen von 0,3 – 0,4 mg eingesetzt, um eine enzymatische Reaktion nachzuweisen [190, 455]. Möglicherweise führten die hohen Proteingehalte zu einer unspezifischen TAM-Umsetzung. Andererseits zeigten *In-silico*-Analysen zum Verwandschaftsgrad der einzelnen *YUC*-Mitglieder, dass YUC8 und YUC9 eine 73 % identische Aminosäuresequenz aufweisen, während die jeweilige Aminosäure-Identität zu YUC1 bzw. YUC6 zwischen 50 % und 55 % liegt (2.15). Zudem wiesen Verwandschaftsanalysen die gleiche phylogenetische Klade für YUC8 und YUC9, jedoch eine jeweils andere Klade für YUC1 und YUC6 auf

[63]. Möglicherweise bewirken diese Sequenzdifferenzen Unterschiede bei der Ausbildung der korrekten Proteinkonformation, so dass die publizierte Expressionsstrategie für YUC1 und YUC6 nicht ohne weiteres auf YUC8 und YUC9 angewendet werden kann.
Einige Proteine können auch mit Hilfe verschiedener Proteinfusionen nicht korrekt im prokaryotischen Wirtssystem synthetisiert werden [88]. Teilweise sind für das korrekte Funktionieren und die erforderliche Löslichkeit eukaryotischer Proteine posttranslationale Modifikationen erforderlich. So werden wegen der reduzierenden Bedingungen im Cytoplasma schlechter Disulfidbrücken gebildet. Zudem sind häufige Modifizierungen, wie z.B. Glykosylierung, Phosphorylierung, Methylierung oder Acetylierung, für eukaryotische Proteine nicht ohne weiteres möglich. Auch der Einbau von Cofaktoren, wie es der Fall bei den YUC-Proteinen ist, kann durch die prokaryotische Umgebung gestört sein. Um diese Probleme zu umgehen, gibt es die Möglichkeit, eukaryotische Expressionssysteme, wie zum Beispiel verschiedene Hefesysteme wie *Pichia pastoris* oder *Saccharomyces cerevisiae*, einzusetzen [37, 84]. Zudem werden vermehrt Zellkultursysteme von Pflanzen und Insekten zur Überexpression genutzt [160, 174]. Neben den generellen Unterschieden zwischen Pro- und Eukaryoten ist für verschiedene Organismen beschrieben, dass synonyme Codons unterschiedlich häufig genutzt werden [351]. Dabei sind diejenigen Codons überrepräsentiert, die von häufiger vorkommenden tRNAs erkannt werden, wodurch es zu einem Translationsvorteil der Gene kommt, welche die bevorzugten Codons verwenden [52]. Daher kann es für heterolog eingebrachte Gene zu einem Ausbleiben einer funktionalen Expression kommen. Dem kann vorgebeugt werden, indem der „codon usage“ mit synthetisch hergestellten Genen angepasst oder ein anderer Organismus zur Expression verwendet wird [158, 315].
In-silico-Analysen (2.15) lieferten Hinweise auf eine posttranslationale Modifikation von YUC8 und YUC9. So zeigten sich für YUC8 20 und für YUC9 16 mögliche Phosphorylierungsstellen. Da anzunehmen ist, dass diese Modifikationen für eine erfolgreiche Proteinkonformation von YUC8 und YUC9 benötigt werden, wurde eine Überexpression in dem eukaryotischen Organismus *P. pastoris* [81] angestrebt (3.1.2). Die methylotrophe Hefe *P. pastoris* hat sich aufgrund der einfachen Handhabung, genetischer Manipulierbarkeit und hohen Expressionsmengen zu einem weitverbreiteten Expressionssystem entwickelt [80]. So ermöglicht die induzierbare Expression posttranslationale Modifikationen, welche in Prokaryoten nicht gegeben sind [47, 364]. Neben cytoplasmatisch exprimierenden Konstrukten wurden zusätzlich Plasmide verwendet, welche die Sezer-

nierung der Fusionsproteine in das Medium erlaubten. Jedoch konnte trotz Verwendung mehrerer Proteaseinhibitoren (2.7.2) keine Proteinproduktion detektiert werden.
Da die heterologe Expression in der Hefe *P. pastoris* keine Proteinaufreinigung ermöglichte, wurden in Kooperation mit H. Frerigmann (Universität zu Köln) homologe Expressionsstudien mit *Arabidopsis*-Wurzelzellkulturen durchgeführt (3.1.3). Die Expression von *YUC8* und *YUC9* im ursprünglichen Organismus sollte durch den nativen Codon-Gebrauch sowie pflanzeneigene Proteinmodifikationen bestmögliche Expressionsbedingungen bieten. Sowohl die Farbe als auch der Geruch der *YUC8*- und *YUC9*-transfizierten Zellsuspensionen unterschieden sich zum Ende der Probennahme deutlich von den Kontrollzellen (persönliche Mitteilung H. Frerigmann), was auf eine expressionsbedingte phänotypische Auswirkung hindeutet. Dennoch konnten auch hier keine funktionellen Proteinfraktionen aufgereinigt werden. Dabei halfen weder die Verwendung eines Proteaseinhibitoren-Cocktails (2.7.3) noch die Reduzierung der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation mittels des Proteasom-Inhibitors MG132 [213, 316]. Es konnte lediglich in den mit *YUC8*tap- und *YUC9*tap-transfizierten *Arabidopsis*-Wurzelzellkulturen eine Expression unlöslicher Proteine nachgewiesen werden. Wahrscheinlich erfolgte, bedingt durch den TAP-Anhang, eine teilweise Falschfaltung, was die Proteindegradation zwar unterbunden hat, hingegen zu unlöslichen Einschlusskörpern führte.
Neben den phänotypischen Analysen sollten die transienten Überexpressionsstudien in *Nicotiana benthamiana* auch zur Aufreinigung von YUC8- und YUC9-Fusionsproteinen verwendet werden. Abbildung 3.8 zeigt den kontinuierlichen Anstieg von *YUC8*:*myc*-Transkriptmengen nach Infiltration der Blätter. Trotz der hohen Transkriptgehalte und der phänotypischen Auswirkungen der *YUC8*- bzw. *YUC9*-Überexpression (Abb. 3.7) konnten keine Fusionsproteine detektiert werden. Auch in den anderen drei verwendeten Überexpressionssystemen in *A. thaliana* wurden hohe Transkriptmengen detektiert, jedoch konnten hier ebenfalls keine Fusionsproteine nachgewiesen werden. Ein breites Spektrum an Proteaseinhibitoren (2.7.3), hochsensitive Detektionsmöglichkeiten (2.8.4), Antikörper gegen verschiedene Epitope (2.2.2), die Untersuchung unterschiedlicher Gewebebereiche und Entwicklungszeitpunkte sowie die gezielte Induktion der Überexpression mit *YUC8*ind- und *YUC9*ind-Linien erbrachten keinen Nachweis von YUC8- bzw. YUC9-Proteinen.
Dies und die Tatsache, dass bisher keine Arbeitsgruppe YUC-Proteine *in planta* nachweisen konnte, deuten auf eine sehr kurze Halbwertszeit der YUC-Mitglieder hin. Denkbar wäre eine gewebespezifische katabole Regulation zur Steuerung des YUC-Gehalts

in vivo, um dadurch unter physiologischen Bedingungen eine genaue Feinabstimmung der Auxinhomöostase zu ermöglichen. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen Funktion und Halbwertszeit der Proteine. So wurde bereits für andere an der Auxinantwort beteiligte Genprodukte, wie beispielsweise SAUR („small auxin up RNA“) oder Aux/IAA-Transkriptionsfaktoren, eine relativ kurze Halbwertszeit von wenigen Minuten beschrieben [2, 192]. Im Fall der Aux/IAA-Genprodukte konnte zudem gezeigt werden, dass die Stabilität der Proteine mit steigender Auxinkonzentration abnimmt [400, 453]. Bei näherer Betrachtung der Auxinwirkweise erscheinen diese kurzlebigen Mechanismen notwendig, um entwicklungsspzezifische und zeitlich genau definierte Auxinmaxima zu ermöglichen. So wird über lokale Auxinmaxima beispielsweise die Phyllotaxis und Wurzelentwicklung durch die Anlage von Primordien gesteuert [14, 359]. Eine Ubiquitin-vermittelte YUC8- bzw. YUC9-Proteindegradation über das 26S-Proteasom, wie es für die Aux/IAA-Proteine bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden. Zwar wurden Protein-Aufarbeitungsstudien unter Verwendung des Proteasom-Inhibitors MG132 durchgeführt, eine Anzucht der Überexpressionslinien auf MG132-haltigem Medium steht jedoch noch aus. Sollten YUC8 und YUC9 spezifisch über das 26S-Proteasom degradiert werden, könnte durch die MG132-Inhibierung im Anzuchtmedium möglicherweise ein Nachweis der *YUC8*- bzw. *YUC9*-Fusionsproteine in den Überexpressionslinien gelingen.
Aufgrund der bisher unbekannten stringenten YUC-Proteinregulation *in planta* kann eine überaus starke enzymatische Aktivität der YUC-Enzyme angenommen werden, um auch in geringen, nicht nachweisbaren Mengen solch ausgeprägte Phänotypen zu ermöglichen. Es wurde auch die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass *YUC8* bzw. *YUC9* bereits auf RNA-Ebene zu physiologischen Änderungen führen. *In-silico*-Vorhersagen der *YUC8*- und *YUC9*-RNA-Sekundärstruktur zeigten jedoch keine Übereinstimmung mit funktionalen Domänen bekannter eukaryotischen Riboregulatoren (persönliche Mitteilung J. F. Kortmann, Ruhr-Universität Bochum). Für eine Translation der mRNA spricht außerdem, dass die Datenbankanalysen eine interne Ribosomen-Bindestelle im 5'-Bereich aufzeigten. Eine regulatorische Aktivität von *YUC8* und *YUC9* auf RNA-Ebene kann daher weitgehend ausgeschlossen werden.
Die Wurzelwuchsstudien von *YUC8*ox und *YUC9*ox auf supplementiertem Medium sollten Aufschluss über mögliche Substrate bzw. Abhängigkeiten *in vivo* ermöglichen (Abb. 3.21). Durch einen erhöhten Anteil von YUC8 bzw. YUC9 kommt es zur verstärkten Umsetzung der präferierten Metabolite, was wiederum Rückschlüsse auf mögliche Synthesewege erlaubt. Indol-3-acetamid (IAM) und TAM wurden als mögliche Substrate

eingesetzt, zeigten jedoch keine Auffälligkeiten. Wäre beispielsweise TAM tatsächlich das bevorzugte Substrat von YUC8 bzw. YUC9, hätte dies bei steigenden Substratkonzentrationen häufiger umgesetzt werden müssen. Dadurch wären die Auxinmengen *in planta* stärker angestiegen, was eine Hemmung des Wurzelwachstums bewirkt hätte. Da auch in hohen Substratkonzentrationen keine Veränderung zu sehen war, handelt es sich bei TAM wahrscheinlich nicht um das *In-vivo*-Substrat. Möglich wäre jedoch auch, dass TAM nicht über die Wurzeln aufgenommen wurde und es dadurch zu keiner Verstoffwechslung mit verändertem Phänotyp kam. Jedoch konnte TAM bisher nicht als endogene Komponente in *A. thaliana* nachgewiesen werden. Das Vorkommen von TAM wurde nur in einigen Pflanzen wie *Hordeum vulgare* oder *Solanum lycopersicum* beschrieben [77, 343]. Die Untersuchung mit isotopenmarkierten Vorstufen zeigte jedoch, dass TAM dort keine Vorstufe von Auxin darstellt [77, 134]. TAM wurde ebenfalls in *Oryza sativa* nachgewiesen, ist dort jedoch an der Serotonin-Bildung beteiligt [125, 171]. Zudem hat sich herausgestellt, dass die für eine TAM-Synthese erforderlichen TDC-Enzyme in *A. thaliana* nicht vorhanden sind und *A.-thaliana*-Pflanzenextrakte keine TDC-Aktivität aufweisen [215]. Alles in allem deuten die Hinweise auf einen anderen YUC-katalysierten Reaktionsschritt hin.
Im Gegensatz zu den homologen Expressionsstudien sowie zu den stabilen Überexpressionslinien war es mit den GFP-Studien erstmalig möglich, lösliche YUC8- und YUC9-Proteine *in planta* nachzuweisen (Abb. 3.26). Möglicherweise verhindert der GFP-Anhang eine putative Degradation des Fusionsproteins. Obwohl bei den in dieser Arbeit analysierten Überexpressionslinien N- bzw. C-terminale Anhänge zur Immundetektion verwendet wurden, kann ein Abspalten bzw. eine Degradation des fusionierten Anhangs sowohl N- als auch C-terminal nicht ausgeschlossen werden, wodurch eine Detektion nicht möglich wäre. Zunächst wäre es interessant zu wissen, ob die GFP-Fusionsproteine eine physiologische Aktivität aufzeigen. Hierfür würde sich die Umklonierung der YUC8- bzw. YUC9-GFP-Fusionskonstrukte in ein T-DNA-vermittelndes Transformationssystem anbieten. Eine darauf folgende transiente Expression in Tabakblättern würde eine physiologische Aktivität durch die spezifische Blattkrümmung anzeigen. Zu erwarten wäre eine Fluoreszenz der GFP-Fusionsproteine in den Krümmungsbereichen. Anschließend könnte das Blattgewebe aufgearbeitet und die Fusionsproteine mit Hilfe des neu entwickelten GFP-Trap®-Systems aufgereinigt werden. Das GFP-Trap®-System basiert auf einem Antikörper, der als Nano-GFP-Bindemolekül eine Einschritt-Aufreinigung GFP-markierter Proteine und gleichzeitig der interagierenden Faktoren erlaubt [322].

Mit Hilfe von funktionell exprimierten YUC-Proteinen aus Pflanzen könnten Aktivitätsmessungen zur Substratspezifität durchgeführt werden. Seit Entdeckung von YUC1 vor knapp zehn Jahren [455] hat sich herausgestellt, dass die *YUC*-Genfamilie essentiell für die pflanzliche Entwicklung ist, die Mitglieder einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Auxinbiosynthese katalysieren und es in jeder höheren Pflanze YUC-Homologe gibt. Bisher ist es jedoch weder gelungen, funktionelle YUC-Proteine aus Pflanzen aufzureinigen, noch eine zweifelsfreie *In-vitro*-Charakterisierung von heterolog aufgereinigten Fusionsproteinen durchzuführen. Die GFP-Bilder in Abbildung 3.26 zeigen die Möglichkeit, lösliche YUC-Proteine *in planta* zu exprimieren und nachzuweisen. Aufgrund der elementaren Bedeutung der YUC-Familie bei der pflanzlichen Entwicklung und im Auxinhaushalt [63, 65] würde die Auflösung der tatsächlichen enzymatischen Funktion entscheidend zur Aufklärung der Auxinbiosynthese beitragen. Sollte es mit dem GFP-Trap®-System gelingen, erstmalig funktionsfähige YUC-Fusionsproteine aus Pflanzen aufzureinigen und damit die Substratspezifität zu bestimmen, würde das gleichzeitig einen wichtigen Schritt zum besseren Verständnis pflanzlicher Wachstums- und Entwicklungsprozesse bedeuten.

4.3 Untersuchungen zur physiologischen Funktion von *YUC8* und *YUC9 in planta*

Zur Charakterisierung der physiologischen Funktion von Genen und ihren Genprodukten *in vivo* helfen sowohl Nullmutanten („loss-of-function“; „knock-out“) als auch Überexpressionslinien („gain-of-function“; „over-expression“). Die Analyse dieser Funktionsmutanten ist dabei einer der effektivsten Wege, um über die phänotypischen Veränderungen Rückschlüsse auf die Genfunktion zu erhalten [207].
Zur Verifikation der phänotypischen Beobachtungen und der daraus abgeleiteten Hypothesen wurden zudem Promotor-Reportergenlinien erstellt. Als Promotorregion wurden die Gensequenz drei Kilobasenpaare stromaufwärts sowie die ersten sechs Basentripletts von *YUC8* bzw. *YUC9* verwendet, mit dem codierenden Gen der β-Glucuronidase aus *E. coli* (*uidA*, GUS) fusioniert und stabil in *A. thaliana* transformiert (3.9.1; Bezeichnung: *YUC8*gus und *YUC9*gus). Kommt es in der Pflanze zur Aktivierung der Promotorregion, folgt daraus eine erhöhte Expression des *uidA*-Reportergens und damit eine Erhöhung des GUS-Gehalts. Die Menge produzierter GUS kann in einer histochemischen Farbreaktion nachgewiesen werden und äußert sich in einer proportional zunehmenden Blaufärbung [175]. Über die entwicklungs- und gewebespezifische Intensität der Blau-

färbung können so Rückschlüsse auf die Promotoraktivität und damit die spezifische Genaktivität von *YUC8* und *YUC9* gezogen werden. Es muss jedoch angemerkt werden, dass es sich bei Promotor-Reportergenkonstrukten immer um einen indirekten Nachweis handelt. Die Promotoraktivität wird zwar angezeigt, jedoch kann die tatsächlich vorliegende, aktive Proteinmenge durch Transport-, Konjugations- oder andere posttranskriptionale und posttranslationale Regulationsmechanismen nicht vorausgesagt werden. Die Methode bietet dennoch eine sehr gute Möglichkeit, gewebespezifische Unterschiede zu erkennen und Induktionsbedingungen näher zu analysieren.
Das ubiquitäre Vorkommen von *YUC*-Homologen spricht für eine wichtige Funktion bei der pflanzlichen Entwicklung. Pflanzen, in denen mehrere *YUC*-Gene mittels T-DNA-Insertionen ausgeschaltet wurden, zeigen eine ausgeprägte Veränderung des Phänotyps [63]. Zur Charakterisierung der physiologischen Funktion von *YUC8* und *YUC9 in planta* wurde sowohl die Charakterisierung von *YUC8*- und *YUC9*-T-DNA-Nullmutanten durchgeführt (3.4) als auch angestrebt, RNAi-Linien (RNA-Interferenz) zu erstellen (AGRIKOLA) [163], um einen „knock-down“ der Genexpression zu erreichen. Da sich jedoch bereits früh abzeichnete, dass der *YUC8*- und *YUC9*-Genverlust milde phänotypische Veränderungen mit sich bringt, wurde die Konstruktion entsprechender RNAi-Linien nicht weiter verfolgt. Nullmutanten zeigen jedoch nicht immer einen sichtbar veränderten Phänotyp. Dies liegt daran, dass entweder redundante Gene die Genfunktion übernehmen oder der Genverlust unter den untersuchten Bedingungen keinen morphologischen Effekt bewirkt [42]. Die Charakterisierung der Nullmutanten wurde daher im Kontext mit anderen Untersuchungen betrachtet.
Studien über den Einfluss einer *YUC8*- bzw. *YUC9*-Überexpression wurden mit drei verschiedenen Strategien durchgeführt (3.4). Hergestellte Linien von *YUC8* bzw. *YUC9* unter Kontrolle eines *35S*-Promotors (Abb. 6.3) dienten der phänotypischen Charakterisierung (Bezeichnung: *YUC8*ox und *YUC9*ox). Der virale Promotor führte dabei zu einer konstitutiven Expression *in planta*. Die Konstrukte unter Verwendung des TAP-Systems (Abb. 6.4) sollten in erster Linie zur Aufreinigung von Proteinkomplexen [318, 325] und als unabhängiges zweites System zur Beschreibung der Überexpressionsphänotypen verwendet werden (Bezeichnung: *YUC8*tap und *YUC9*tap). Der TAP-Anhang sollte hierbei mit seiner doppelten Protein-A-IgG-Bindedomäne eine Aufreinigung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen ermöglichen. Als dritte Strategie wurde ein induzierbares Expressionssystem genutzt (Abb. 6.5), um möglichen toxischen Überexpressionseffekten von *YUC8* und *YUC9* begegnen zu können (Bezeichnung: *YUC8*ind und *YUC9*ind). In diesem Fall ist die Expression von *YUC8* und *YUC9* durch Zuga-

be von β-Estradiol stringent kontrollierbar [460]. Mit diesem System können neben unterschiedlichen biotischen und abiotischen Faktoren auch verschiedene pflanzliche Entwicklungsstadien im Zusammenhang mit einer induzierten Überexpression untersucht werden. Zusätzlich kann die Bestimmung der Metabolite mit gekoppelten *In-vivo*-Analysen zur Substratspezifität auf supplementiertem Medium vor und nach Induktion weiteren Aufschluss über die physiologische Aktivität geben.
Zur Analyse, ob die erstellten *YUC8*- und *YUC9*-Überexpressionskonstrukte einen phänotypischen Einfluss *in planta* bewirken, wurden die Konstrukte zunächst zur transienten Expression in *Nicotiana-benthamiana*-Blätter infiltriert. Es zeigten sich bereits nach einigen Stunden leichte Blattkrümmungen, welche nach einem Tag besonders auffällig waren (Abb. 3.7 B und C). Die mikroskopischen Betrachtung zeigte eine deutliche Streckung der Epidermiszellen auf etwa 250 % innerhalb von 24 Stunden (Abb. 3.7 E – G). Die rapide Zellstreckung bewirkte dabei einen Turgorverlust, wodurch die Blätter sich krümmten und eine Art Welke-Erscheinung aufwiesen. Die epinastischen Blätter sind dabei ein Zeichen für einen gesteigerten Auxingehalt in der Pflanze [184]. Der durch die *YUC8*- bzw. *YUC9*-Überexpression möglicherweise gesteigerte Auxingehalt könnte wiederum die beobachtete Zellexpansion verursachen [251, 340]. Zusätzliche Versuche mit infiltrierten *Nicotiana-tabacum*-Blättern bestätigten die physiologische Wirkung und zeigten ebenfalls verstärkte Blattkrümmungen. Die erstellten Überexpressionskonstrukte von *YUC8* und *YUC9* führten demnach in artfremden Pflanzen zu schnellen morphologischen Veränderungen. Dies wiederum spricht für einen konservierten Reaktionsmechanismus. Interessanterweise zeigten *YUC8*tap und *YUC9*tap erst nach zwei Tagen eine vergleichbare Blattkrümmung. Aufgrund des doppelten *35S*-Promotors, im Vergleich zu einem einfachen *35S*-Promotor in *YUC8*ox und *YUC9*ox, wäre eine schnellere Reaktion zu erwarten gewesen. Der Effekt lässt sich einerseits durch den N-terminalen Affinitätsanhang erklären (2.4.2), welcher die Aktivität des Fusionsproteins minimieren könnte. Andererseits könnten durch die höhere Promotoraktivität verstärkte PTGS-Mechanismen („post-transcriptional gene silencing“) in den Blättern den Expressionserfolg insgesamt schmälern, wodurch der Blattkrümmungseffekt erst später auftritt. In Pflanzen spielt der PTGS-Mechanismus eine wichtige Rolle bei Entwicklungsprozessen [20, 295] sowie bei der Abwehr von Viren [327, 360]. Eine Überexpression kann daher zur Unterdrückung der Gen-Transkription (Co-Suppression) und dadurch zu ungenügender Expression führen. Bei diesem Vorgang wird gezielt die mRNA eines Gens sequenzspezifisch degradiert [366]. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wurde eine Co-Expression mit einem viralen Suppressor von pflanzlichen PTGS-Mechanismen durchgeführt. Das p19-Protein

vom Tomaten-Mosaikvirus sollte dadurch eine höhere transiente Expressionsrate ermöglichen [422]. Der Zeitpunkt bis zur Ausbildung des epinastischen Blattphänotyps unterschied sich dabei nicht von den Pflanzen ohne zusätzliche Expression von p19, weshalb die spätere Blattkrümmung bei *YUC8*tap bzw. *YUC9*tap eher auf eine reduzierte Aktivität durch die N-terminale Fusion zurückzuführen ist.
Bei den stabil erstellten *A. thaliana*-Überexpressionslinien zeigten die Konstrukte mit einfachem *35S*-Promotor als auch die TAP-Linien und die induzierbaren Pflanzenlinien nach Induktion massive Veränderungen im phänotypischen Erscheinungsbild (3.5). Da die Überexpressionsphänotypen von *YUC8*ox/tap und *YUC9*ox/tap nahezu identisch waren, wird teilweise auf nur eine Linie exemplarisch eingegangen. Die Vergleiche erfolgten dabei mit *A. thaliana* Col-0-Wildtyppflanzen, welche auch zur Herstellung der Mutanten verwendet wurden.
Ergänzend muss zu den phänotypischen Untersuchungen gesagt werden, dass bei der Analyse von Überexpressionslinien, welche zudem in den Phytohormonhaushalt eingreifen, die beobachteten Phänotypen artifizieller Natur sein können. Die ausgeprägten Phänotypen der *YUC8* und *YUC9*-Überexpressionspflanzen sind offensichtlich durch erhöhte Auxingehalte bedingt. Die konstitutive Expression von Genen, welche einen gesteigerten Auxingehalt bewirken, führt erwartungsgemäß zu einem ausgeprägten Phänotyp, da sie nahezu an jedem pflanzlichen Entwicklungsprozess beteiligt sind und in unterschiedlichen Konzentrationen gegensätzliche Wirkungen in verschiedenen Geweben zeigen können [392]. Zwar ähneln sich die Phänotypen von *YUC8*ox und *YUC9*ox bedingt durch die *35S*-Promotor vermittelte Überexpression, unterscheiden sich dennoch in manchen phänotypischen Ausprägungen voneinander und teilweise von bereits beschriebenen *YUC*-Überexpressionsmutanten. Die Beobachtungen und die daraus abgeleiteten Hypothesen gaben Hinweise für weitere zielgerichtete Analysen.
Bereits im Keimlingsstadium waren die verlängerten Hypokotyle und Petiolen sowie die epinastische Kotyledonen sichtbar (Abb. 3.10). Auch wiesen ältere Pflanzen die typischen namensgebenen lanzettförmig-gestreckten Blätter auf (Yucca-Pflanze), wie sie bereits für mehrere *YUC*-Überexpressionsphänotypen beschrieben wurden [190, 455]. Dass die Überexpression von *YUC8* und *YUC9* zu einem typischen Auxinüberproduzierphänotyp [38, 141] führte, war der erste Hinweis auf eine mögliche Funktion in der Auxinbiosynthese. Der Verlust beider Gene zeigte in der *yuc8/yuc9*-Doppel-Nullmutante auf den ersten Blick jedoch keine phänotypischen Auffälligkeiten. Dieses Eigenschaft wurde bereits für andere Nullmutanten der *YUC*-Genfamilie beschrieben, wo aufgrund

der hohen Redundanz innerhalb der *YUC*-Familie erst bei Dreifachmutanten deutlich sichtbare Veränderungen erkennbar waren [63, 65].
Im Bereich der Sprossentwicklung war die enorme Trieblänge der *YUC8*- und *YUC9*-Überexpressionslinien auffällig (Abb. 3.13). Die Primärtriebe zeigten dabei eine ausgeprägte Apikaldominanz und erreichten die doppelte bis dreifache Länge im Vergleich zum Wildtyp, wodurch sie weitestgehend nicht in der Lage waren, ihr eigenes Gewicht zu tragen, und gestützt werden mussten. Das ausgeprägte Wachstum der Triebe lässt sich auf eine verlängerte Aktivität des apikalen Sprossmeristems zurückführen. Ausgehend vom Sprossapikalmeristem wurde gezeigt, dass Auxin eine zentrale Bedeutung bei der Verzweigung und Bildung von Seitenorganen spielt [219, 275]. Sowohl die Etablierung als auch die Aufrechterhaltung der undifferenzierten Zellen des Sprossapikalmeristems wird dabei hauptsächlich von STM („shoot meristemless“) gewährleistet [104, 230]. Der pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktor STM aus der *KNOX*-Genfamilie („knotted-like homeobox“) wird insbesondere im Meristem und in den interprimordialen Bereichen exprimiert [229, 346]. An Stellen der Organinitiierung und somit Determinierung der Zellen erfolgt eine Reprimierung der *KNOX*-Gene [406], welche durch transportbedingte unterschiedliche Auxinkonzentrationen ausgelöst wird [159, 338]. Die *YUC8*- bzw. *YUC9*-Überexpression bewirkt eine unphysiologische Auxinhomöostase, wodurch die Auxin-Transportmechanismen nur bedingt die erforderlichen Konzentrationsunterschiede aufbauen können und es möglicherweise daher zur verminderten Bildung von Primordien und zu einer entsprechend verstärkten Apikaldominanz kommen könnte.
Die Untersuchung des Stängelhabitus zeigte weitere morphologische Veränderungen auf. Insbesondere in den oberen Bereichen des Primärtriebs konnte ein verstärktes Zick-Zack-Wachstum beobachtet werden (Abb. 3.14 A). Ein ähnlicher Phänotyp ist bei der Überexpression eines mutierten Aux/IAA17-Repressors zu beobachten [221]. Die Mutation der Domäne II von Aux/IAA-Repressoren führt zur erhöhten Stabilität [286], da diese nicht mehr von dem SCF^{TIR1}-Komplex erkannt und daher nicht abgebaut werden können [333]. Aufgrund des fehlenden Abbaus kommt es zur verstärkten Repression Auxin-responsiver Gene [286]. Durch eine N-terminale Fusion des mutierten Aux/IAA-Repressors mit der Aktivierungsdomäne des Herpes-simplex-Virus P16 wird die Repressor-Aktivität in eine Aktivator-Funktion umgewandelt, so dass dadurch die entsprechende Expression Auxin-responsiver Gene gewährleistet ist [401]. Für Aux/IAA17 konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einer stabilisierten Aux/IAA17-Repressor-Version zu Auxinmangelphänotypen führt, während die zusätzlich mutierte Aux/IAA17-Aktivator-Version Auxinüberproduktionsphänotypen

aufweist, wobei sich in beiden Fällen die Auxingehalte *in planta* nicht signifikant unterscheiden [221]. Das bedeutet, dass die Überexpression stabilisierter Aux/IAA-Faktoren die Auxinantwort unabhängig von der Auxinkonzentration beeinflussen kann.
Interessanterweise ähneln die Phänotypen der Aux/IAA17-Repressor-Version mit einer verringerten Anzahl von Lateralwurzeln sowie einem kürzerem Hypokotyl denen der *yuc8/yuc9*-Nullmutante (Abb. 3.20 B – D). Hingegen gleicht die Aux/IAA17-Aktivator-Version mit mehr Lateralwurzeln, einem längeren Hypokotyl und einer vermehrten Wurzelhaarbildung den Phänotypen von *YUC8*ox und *YUC9*ox. Zudem weist sie im Gegensatz zu anderen Auxinüberproduktionsmutanten das bei *YUC8*ox beobachtete Zick-Zack-Wachstum auf (Abb. 3.14 A). Da die Regulationsmechanismen in den einzelnen Gewebebereichen variieren, wären trotz konstitutiver Überexpression unterschiedliche Auxinkonzentrationen in den Geweben denkbar. Möglich wäre neben der gewebespezifischen und individuellen *YUC*-Regulation eine Anpassung der an der entsprechenden Signaltransduktion beteiligten Komponenten, um die unterschiedlichen Überexpressionsphänotypen zu bewirken. Beispielsweise zeigten Experimente mit Aux/IAA-Repressoren unter Kontrolle verschiedener Promotoren, dass zwar die Expression eine Rolle spielt, die spezifischen Eigenschaften jedoch auch unter einheitlich genutzten Promotoren und bei Überexpression teilweise erhalten bleiben [264, 430]. Auch zeigten *YUC*-Überexpressionmutanten ähnliche aber nicht identischen Phänotypen. Beispielsweise wurde für *YUC6* trotz konstitutiver Überexpression ein veränderter Phänotyp im vergleich zu anderen *YUC*-Überexpressionslinien berichtet. So bewirkte die Überexpression von *YUC6* weder eine verkürzte noch stärker behaarte Wurzel [190]. Dies deutet auf die speziellen Funktionsunterschiede der *YUC*-Mitglieder zur Steuerung verschiedener Aspekte von Wachstum und Entwicklung hin, welche selbst durch eine konstitutive Überexpression unterschiedliche Phänotypen bewirken können. Die möglicherweise gewebespezifisch, *YUC*-abhängigen veränderten Auxingehalte der *YUC*-Überexpressionslinien könnten dadurch die *YUC*-spezifischen Unterschiede in den Phänotypen von Auxinüberproduzierermutanten, wie im Beispiel des Zick-Zack-Wachstums oder der verstärkten Wurzelbehaarung, erklären.

4.4 Verknüpfung von *YUC8* und *YUC9* mit Ethylen und Tryptophan

Bei den Überexpressionslinien fielen die teilweise deutlich verdickten Primärtriebe im unteren Bereich auf, wobei es dort zusätzlich und noch vor der Blütenentwicklung zu verfrühten Seneszenzerscheinungen der Knospen und teilweise ganzer Seitentriebe kam (Abb. 3.14 B – D). In einigen Fällen führte diese Art des sekundären Dickenwachstums

zu einem Aufreißen der Triebe und einem holzähnlichen Phänotyp (Abb. 3.14 E – H). Sowohl die verfrühte Seneszenz der Knospen [317, 324] als auch das holzähnliche Dickenwachstum weisen auf einen Ethyleneffekt hin [178, 336].
Bei Ethylen handelt es sich um ein gasförmiges Phytohormon, welches neben der Fruchtreife an vielen weiteren pflanzlichen Entwicklungsprozessen beteiligt ist [177, 293]. Interessanterweise wirken Auxin und Ethylen in mehreren Bereichen zusammen. So wird die Adventivwurzelbildung sowohl durch Auxin als auch durch Ethylen stimuliert. Meist spielt Ethylen jedoch eine antagonistische Rolle zu Auxin. Beispielsweise wird die Zellelongation durch Ethylen in den meisten Pflanzen unterdrückt. Andererseits wurde bei geringen Ethylenkonzentrationen eine synergistische Elongation mit Auxin beschrieben [188, 381]. Zudem wird die Ethylenproduktion durch einen erhöhten Auxingehalt angeregt, da einige Mitglieder der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der Ethylenbiosynthese, ACC-Synthasen (Aminocyclopropancarbonsäure-Synthasen), spezifisch durch Auxin induziert werden [267]. Möglicherweise beruht der Ethylenphänotyp der *YUC8*- und *YUC9*-Überexpressionslinien auf einer verstärkten Auxinüberproduktion und der dadurch erhöhten Induktion des ACC-Synthase-Gens *ASC4* in *A. thaliana* [3]. Ob die Ethylenproduktion in diesen Linien tatsächlich erhöht ist, soll zukünftig in einer Kooperation mit R. Pierik (Universität Utrecht, Niederlande) analysiert werden. Die Transkriptgehalte der ACC-Synthase-Gene könnten mittels quantitativer Transkriptstudien auf Veränderungen überprüft werden.
Eine Verholzung geht mit einem verstärkten Grad an Lignifizierung einher. Bereits die Trocknung einzelner Gewebebereiche zeigte, dass konstitutive *YUC8*- und *YUC9*-Überexpressionslinien aufgrund der Zellwandverhärtungen im Gegensatz zum Wildtyp kein Volumen einbüßten (Abb. 3.15 A). Der qualitative Ligninnachweis bestätigte den erhöhten Lignifizierungsgrad in diesen Linien (Abb. 3.15 B und C). Im Gegensatz zur qualitativen Ligninfärbung älterer Pflanzen zeigten die quantitativen Analysen junger Keimlinge kaum Unterschiede im Ligningehalt zwischen Col-0, *YUC8*ox, *YUC9*ox und *yuc8/yuc9* (Abb. 3.16). Die Ligningehalte in den Keimlingen unterschieden sich wahrscheinlich deshalb nur gering, weil erst eine konstitutive und dauerhafte *YUC8*- bzw. *YUC9*-Überexpression zu vermehrten Ligninmengen führt und diese Merkmale erst in ausgewachsenen Pflanzen ersichtlich werden. Aufgrund der geringen Mengen würde sich eine Wiederholung in größerem Maßstab mit älteren Pflanzen anbieten. Keimlinge, welche auf MeJA-haltigem Medium angezogen wurden, zeigten insgesamt einen deutlichen Anstieg der Lignifizierung (ohne Abbildung), was zusätzlich auf einen Einfluss von JA auf Ethylen hindeutet [287, 302]. Es wurden bereits Verknüpfungen zwischen den

Phytohormonen Ethylen und JA beschrieben. So reguliert der Transkriptionsfaktor ERF1 („ethylene response factor“) die Expression von Genen zur pflanzlichen Abwehr und wird besonders durch Ethylen und Jasmonsäure aktiviert [232]. Eine Überexpression von *ERF1* wiederum bewirkt eine teilweise Wiederherstellung der Pathogenabwehr-defizienten *coi1*- und *ein2*-Mutanten [231]. Insbesondere spielen JA und Ethylen eine Rolle bei der Pathogenabwehr [135, 434]. Einige Pathogene beeinflussen diese pflanzliche Regulation durch Phytohormone aktiv, um die eigene Virulenz zu erhöhen [62, 412]. Pflanzen reagieren auf diesen Pathogenbefall wiederum mit einer erhöhten Lignin-synthese, durch die eine physikalische Barriere gegen die Pathogenausbreitung bewirkt wird [214, 413].
Wurzelwuchstudien auf weiteren supplementierten Medien zeigten, dass *YUC8*ox und *YUC9*ox weniger sensitiv auf AIB (α-Aminoisobuttersäure) und 5-MT (5-Methyltryptophan) reagierten. Während hohe Konzentrationen beim Wildtyp zur Letalität führten, waren die Überexpressionslinien noch lebensfähig (Abb. 3.21 B – D). AIB ist ein Strukturanalogon der Ethylen-Vorstufe ACC und inhibiert als kompetitiver Hemmstoff in hohen Konzentrationen die ACC-Oxidase an der Ethylenbildung [289, 335]. Die höhere Toleranz lässt sich über die Verknüpfung von Auxin und Ethylen erklären. Die erhöhten Auxingehalte in *YUC8*ox und *YUC9*ox führen zur spezifischen Induktion von ACC-Synthase-Genen [3]. Dadurch kommt es zur verstärkten Bildung von ACC. Höhere Mengen an ACC wiederum können mit AIB um Bindestellen der ACC-Oxidase konkurrieren, wodurch eine höhere Ethylenproduktion im Vergleich zum Wildtyp gegeben ist und daher die letale Dosis bei *YUC8*ox bzw. *YUC9*ox erst mit höheren AIB-Konzentrationen erreicht wird. Bei 5-MT handelt es sich um ein phytotoxisches Trp-Analogon (Tryptophan). Wird es als Aminosäure während der Proteinbiosynthese eingebaut, kann das durch die geänderte Tertiärstruktur zum Funktionsverlust führen. Erfolgt hingegen eine schnelle Verstoffwechslung, wird der toxische Effekt gedämpft [169]. Da *YUC8*ox und *YUC9*ox eine höhere Toleranz gegenüber 5-MT aufwiesen, kann von einem erhöhten 5-MT-Umsatz ausgegangen werden. YUC8 und YUC9 katalysieren demnach einen Reaktionsschritt in einem Trp-abhängigen Stoffwechselweg. Aufgrund des Auxinüberproduktionsphänotyps der 5-MT-resistenten Überexpressionslinien (Abb. 3.21 C) und weil Trp das Ausgangssubstrat innerhalb der Auxinbiosynthese darstellt (Abb. 1.1), deutet dies auf eine Funktion von YUC8 und YUC9 als Schlüsselenzyme in der Trp-abhängigen Auxinsynthese hin.
In den Überexpressionslinien zeigten sich eine Reihe weiterer Hinweise auf eine Verknüpfung von *YUC8* und insbesondere *YUC9* mit Ethylen. So wurde *YUC9* in semi-

quantitativen Transkriptanalysen durch die Ethylen-freisetzende Chemikalie Ethephon induziert (Abb. 3.6). Auch wiesen die GUS-Analysen eine erhöhte Aktivität des *YUC9*-Promotors durch Zugabe von ACC und Ethephon auf (Abb. 3.34). Es zeigte sich insbesondere nach ACC-Gabe eine verstärkte *YUC9*-Promotoraktivität. Es kann jedoch nicht gesagt werden, dass die künstlich erhöhten Ethylengehalte zu einer direkten Induktion des *YUC9*-Promotors führen. Denkbar wäre auch eine möglicherweise substratabhängige *YUC9*-Induktion durch eine Ethylen-bedingte Steigerung der Trp-Synthese [172, 371]. Es konnte gezeigt werden, dass Auxin die Ethylenproduktion fördert und Ethylen über die Inaktivierung des negativen CTR1-Regulators („constitutive triple response“) [188] ASA1 („anthranilate synthase“; *wei2*; „weak ethylene insensitive“) und ASB1 (*wei7*) induziert [371]. ASA1 und ASB1 führen zu einer gesteigerten Trp-Biosynthese. In semiquantitativen RT-PCR-Analysen konnte eine schwache Induktion von *YUC8* und *YUC9* durch Trp, und zusätzlich für *YUC9* durch 5-MT festgestellt werden (Abb. 3.6). Die ACC- bzw. Ethephon-Gabe könnte daher möglicherweise durch die gestiegene Trp-Synthese zu der beobachteten *YUC9*-Induktion führen.
Interessanterweise zeigten *In-silico*-Analysen unter Verwendung der Genevestigator-Datenbank [167] eine Rolle von *YUC8* in einem CTR1-abhängigen Regulationsmechanismus. So ist der *YUC8*-Transkriptgehalt in der *ctr1*-Nullmutante um den Faktor zwölf hochreguliert, während bei *YUC9* keine Veränderungen dokumentiert sind. Dies deutet insbesondere auf einen *YUC8*-spezifischen Rückkopplungsmechanismus hin. Die Beobachtungen, dass *YUC9* im Gegensatz zu *YUC8* durch Ethylenvorstufen induziert wird (Abb. 3.34), *YUC8* hingegen in *ctr1* hochreguliert ist und beide weniger sensitiv auf AIB reagieren, deuten auf einen kooperativen Mechanismus der Ethylen-induzierten Auxinbiosynthese hin. Kreuzungen der Promotor-GUS-Linien mit *ctr1*, *wei2* und *wei7* sowie *yuc8* und *yuc9* mit anschließenden Induktions- und Transkriptstudien würden weitere Rückschlüsse auf die physiologischen Abläufe innerhalb der Auxin-Ethylen-Verknüpfung erlauben.

4.5 Funktion von *YUC8* und *YUC9* bei der Blüten- und Fruchtentwicklung

Eine sehr markante Veränderung stellte der ausgeprägte Blütenphänotyp der transgenen Pflanzen dar (Abb. 3.11). Bei *A. thaliana* handelt es sich um einen Selbstbestäuber. Die Überexpression von *YUC8* bzw. *YUC9* führte hingegen zu einer partiellen Sterilität. Teilweise konnten pro Pflanze lediglich 30 – 40 Samen geerntet werden, was normaler-

weise dem Inhalt einer einzelnen Schote entspricht. Verursacht wurde dies durch ein eingeschränktes Wachstum der Staubblätter, während das Fruchtblatt schneller wuchs. Der Abstand der Narbe von den Antheren war dadurch zu groß, so dass der Pollen nicht übertragen werden konnte und die Überexpressionsmutanten folglich nur eingeschränkt fertiles Saatgut bildeten. Durch manuelle Bestäubung konnte diese Einschränkung umgangen werden, damit ausreichend Saatgut gewonnen werden konnte. In extremen Fällen, insbesondere im Bereich der terminalen Blüte (*YUC8*ox) bzw. einige Zentimeter vor Erreichen der terminalen Blüte (*YUC9*ox), wurden zum Teil keine Staubblätter mehr ausgebildet und es kam zu einer massiven Fehlentwicklung der Blüte. Die Differenzierung und Aufrechterhaltung des Sproassapikalmeristems wird durch eine feinjustierte Auxinhomöostase gewährleistet [275, 346]. Sobald die Pflanze ihre entwicklungstypische Wuchshöhe erreicht, kommt es durch Änderungen der Auxinverhältnisse im Bereich des Sprossapikalmeristems zum Erliegen der meristematischen Funktion. Die durch die *YUC8*- bzw. *YUC9*-Überexpression erhöhten Auxingehalte verursachen während der finalen Entwicklungsperiode des Sprossapikalmeristems möglicherweise eine gestörte Ausbildung der erforderlichen Auxinverhältnisse, welche die abnormen Phänotypen im Bereich der terminalen Blüte erklären würden.
Mit Hilfe der GUS-Analysen konnte gezeigt werden, dass insbesondere *YUC8* eine Funktion bei der Blütenentwicklung inne hat. Während der *YUC9*-Promotor nahezu keine Aktivität in den Blütenorganen zeigte, wies *YUC8*gus in jungen Knospen und entwickelten Blüten eine deutliche GUS-Färbung auf (Abb. 3.30). Es konnte eine intensive *YUC8*-Promotoraktivität in den sich entwickelnden Antheren, in den Blattadern der Kelch- und Kronblätter, in den Filamenten der Staubblätter und in den Eizellen des Fruchtblatts verzeichnet werden (Abb. 3.31). Dabei ist die Aktivität abhängig vom Entwicklungsstadium der Blüte und am intensivsten während der Blütenöffnung, bis sie nach der Selbstbestäubung wieder abnimmt. Während dieser Entwicklungsstufe ist auch der Auxingehalt in der Blüte besonders hoch. Kurz vor der Bestäubung erfolgt die Streckung der Filamente durch eine intensive Zellexpansion, welche durch Auxin vermittelt wird [198]. Die vorherige Pollenreifung in den jungen Antheren wird ebenfalls durch Auxin realisiert [57]. Da die Nullmutante *yuc8* keinen Blütenphänotyp aufweist, kann von einer funktionellen Ersetzung durch andere *YUC*-Mitglieder ausgegangen werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *YUC1*, *YUC2*, *YUC4* und *YUC6* an der Blütenentwicklung beteiligt sind [57, 63]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine zusätzliche Funktion von *YUC8* in dem Bereich, was das redundante Verhalten der *YUC*-Familie untereinander hervorhebt.

Das weibliche *Arabidopsis*-Fruchtblatt besteht aus einer apikalen Narbe, einem kurzen Stylus und dem basalen Fruchtknoten, welcher die Eizellen enthält. Nach Bestäubung der Narbe befruchten die Pollenkörner über den einwachsenden Pollenschlauch die Eizellen. Die anschließend einsetzende Embryonalentwicklung äußert sich über die Differenzierung des Zellgewebes, wodurch die Frucht reift und die Schote zu wachsen beginnt [115]. Auch wenn die Fruchtblätter in den Überexpressionspflanzen nicht bestäubt wurden, wuchsen sie weiter. Die Fruchtform ähnelte dadurch zwar dem Wildtyp, bildete jedoch kein fertiles Saatgut (Abb. 3.12). Die Schotenentwicklung in *Arabidopsis* ist normalerweise befruchtungsabhängig, was in einer gesteigerten Auxinproduktion resultiert [283]. Bleibt eine Befruchtung aus, werden die Blüten seneszent und sterben ab [60, 274]. Das Phänomen der bestäubungsunabhängig wachsenden Schoten stellt eine Art Parthenokarpie dar, eine Fruchtentwicklung bei Pflanzen ohne vorherige Befruchtung und Samenbildung. Bereits früh wurde entdeckt, dass die Applikation von exogenem Auxin bei Blüten eine Parthenokarpie auslösen kann [149]. Spätere Versuche mit natürlichen und synthetischen Auxinen bestätigten dies in einer großen Bandbreite von Pflanzen [139, 345, 420]. Zudem hemmen auf die Narbe applizierte Auxin-Antagonisten und Auxin-Transport-Inhibitoren das Wachstum des Fruchtblatts nach Bestäubung [187]. Weiterhin wurde ein direkter Nachweis von gesteigertem Auxingehalt und der Fruchtentwicklung mit Hilfe einer Tryptophan-2-Monooxygenase (*iaaM*) erreicht, welche *in planta* zu einer gesteigerten Auxinproduktion führt [321]. Die stabile Integration von *iaaM* unter Kontrolle eines speziell in Fruchtblättern aktiven Promotors bewirkt dabei einen deutlich erhöhten Auxingehalt in den Früchten. Interessanterweise ist bei diesen transgenen Pflanzen keine Bestäubung für eine vollständige Fruchtentwicklung nötig, was sich wiederum in dem Fehlen von fertilen Samen äußert [243, 323]. Das bestäubungsunabhängige Schotenwachstum in *YUC8*ox bzw. *YUC9*ox lässt sich demnach auf eine *YUC8*- bzw. *YUC9*-vermittelte Steigerung der Auxinbiosynthese erklären.
Bei einer manuellen Bestäubung von Blüten der Überexpressionslinien entwickelten sich alle Samen. Da diese verglichen mit dem Wildtyp jedoch bedeutend größer waren, konnten die Schoten der Größe nicht standhalten und platzten auf. Im Schnitt waren die Samen bis zu 40 % größer als Saatgut von Wildtyppflanzen (Abb. 3.12). Die gesteigerte Samengröße beruht wahrscheinlich auf einem erhöhten Auxingehalt, da Auxin sowohl an der Zellteilung als auch besonders an der Zellelongation beteiligt ist. Die Promotor-GUS-Analysen zeigten neben einer *YUC8*-Promotoraktivität auch eine zeitlich und räumlich getrennte Aktivität von *YUC9* in den wachsenden Schoten (Abb. 3.32). Kurz nach der Bestäubung setzte eine intensive *YUC8*-Promotoraktivität ein (Abb. 3.32 A 5 – 9),

die nach einigen Tagen abklang und von *YUC9* für einige weitere Tage abgelöst wurde (Abb. 3.32 A 10 – 12). Neben der Blütenentwicklung ist auch die Entwicklung der Frucht ein durch Auxin gesteuerter Mechanismus [273], zu dem *YUC8* und *YUC9* beitragen.
Die nähere Analyse von *YUC8*gus und *YUC9*gus zeigte distinkte Unterschiede bei der Samenentwicklung (Abb. 3.33). So scheint *YUC8* insbesondere an der Ausbildung des Nucellus und den inneren Integumenten beteiligt zu sein, während die *YUC9*-Promotoraktivität hauptsächlich im Suspensor lokalisiert ist. Obwohl die *YUC8*- als auch die *YUC9*-Genprodukte beide womöglich die gleiche enzymatische Funktion haben, wird hier die sensible, zeitlich und räumlich getrennte und redundante Steuerung der Auxinbiosynthese durch das pflanzliche Entwicklungsprogramm deutlich. Im frühen embryonalen Entwicklungsstadium weist der Suspensor den höchsten Auxingehalt auf [181]. Offensichtlich ist daran ein gesteigerter *YUC9*-Gehalt beteiligt. Kürzlich wurde die elementare Bedeutung eines asymmetrischen Auxingradienten für eine korrekte Embryonalentwicklung aufgezeigt, welcher besonders durch einen gesteigerte und feinjustierte Auxinhomöostase im Nucellus ermöglicht wird [121, 281, 450]. Es wurde bereits eine *YUC1*- und *YUC2*-Promotoraktivität in diesen Regionen nachgewiesen [281]. Die GUS-Studien im Rahmen dieser Arbeit wiesen eine zusätzliche Promotoraktivität von *YUC8* im Nucellus auf. Mittels Kreuzungen von *YUC*-Mehrfach-Nullmutanten mit *YUC*-Promotor-Reportergenlinien könnte die Bedeutung der einzelnen *YUC*-Mitglieder im Hinblick auf eine korrekte Blüten- und Embryonalentwicklung analysiert werden. Interessant ist die Promotoraktivität von *YUC8* in den inneren Integumenten. Die Samenentwicklung unterliegt einer initialen Phase der Endospermzunahme, gefolgt von einer zweiten Phase der Embryonalentwicklung. In der initialen Phase der Endospermentwicklung ist eine verstärkte Zellteilung sowie ausgeprägtes Zellwachstum zu beobachten, wodurch die Größe insgesamt zunimmt. Die darauf folgende Embryonalentwicklung ist dabei an die verfügbare Endospermmenge gebunden. Es konnte gezeigt werden, dass die Größe vollständig entwickelter und reifer Samen besonders von der initialen Phase, der Endospermentwicklung, und der Zellelongation der Integumente abhängig ist [39, 130]. Hieran scheint insbesondere *YUC8* beteiligt zu sein. In *YUC8*ox ist die deutlich erhöhte Samengröße auffällig gewesen. Die Samen waren etwa 17 % größer im Vergleich zu *YUC9*ox (Abb. 3.12 K). Dieser Größenunterschied trotz gleicher Überexpression über einen *35S*-Promotor ist möglicherweise durch die unterschiedliche, vom endogenen Entwicklungsprogramm abhängige, gewebespezifische Genexpression bedingt.
Die Entwicklung und das Wachstum des Fruchtblatts bzw. dessen einzelnen Gewebebereichen ist generell von der Auxinverteilung abhängig [16, 365]. In den *YUC8*- und

YUC9-Überexpressionsmutanten war das veränderte Styluswachstum auffällig (Abb. 3.12). Der Stylus ist das Verbindungsstück zwischen Fruchtknoten und Narbe. Der Effekt eines verlängerten Stylus ist auch hier auf einen durch die Überexpression bedingten erhöhten Auxingehalt zurückzuführen. So konnte gezeigt werden, dass die Familie der STY- und NGA-Transkriptionsfaktoren die Stylus-Entwicklung durch redundante und kooperative Induktion der *YUC2*- und *YUC4*-Expression im apikalen Gynoeceum ermöglichen [8, 102, 404]. Eine Überexpression dieser Transkriptionsfaktoren bewirkt dabei durch die *YUC2*- bzw. *YUC4*-induzierte Genexpression einen erhöhten Auxingehalt und dadurch ein verlängertes Styluswachstum.
Transkriptanalysen mit der *YUC8*-Überexpressionslinie lieferten Hinweise auf die möglichen Regulationsmechanismen. So zeigte sich in *YUC8*ox eine Verstärkung der Transkription von auxinresponsiven Genen (ARF). Als ARFs werden Transkriptionsfaktoren bezeichnet, welche durch Bindung an auxinresponsive *cis*-Elemente Antworten auf das Phytohormon Auxin vermitteln [408]. In *A. thaliana* existieren 23 ARF-Proteine, wobei jedes eine konservierte DNA-Bindedomäne besitzt, um an den entsprechenden Promotorelementen zu binden [277, 304]. Dabei können sie sowohl als Aktivatoren oder Repressoren fungieren [401, 410]. *ARF1* und insbesondere *ARF2* und *ARF8* waren *YUC8*ox hochreguliert, während *ARF6* kaum Veränderungen aufwies (Abb. 3.18).
Der Verlust von ARF1 in der *arf1*-Nullmutante führt zu keinem veränderten Phänotyp, verstärkt jedoch den *arf2*-Phänotyp in einer *arf1/arf2*-Doppelmutante, was auf eine redundante Funktion hindeutet [103]. ARF2 reguliert die Blattseneszenz und die Abszission der Blütenhülle [103, 276]. Der Verlust des ARF2-Repressors in *arf2* bewirkt eine stark erhöhte Samengröße, verkürzte Filamente der Staubblätter und ein verstärktes Dickenwachstum der Triebe [344]. Nähere Analysen ergaben, dass die *arf2*-Mutation zu einer erhöhten Entwicklung der Integumente führt. Generell weist der *arf2*-Phänotyp erstaunlich viele Gemeinsamkeiten mit den *YUC8*ox- und *YUC9*ox-Phänotypen auf. Neben einem verstärkten Sprosswachstum, verdickten Primärsprossen, verlängertem Fruchtblattwachstum und der veränderten Samengröße ist auch eine deutlich verzögerte Seneszenz beschrieben [103, 222, 277, 344]. Die verzögerte Seneszenz konnte auch in den *YUC8*- und *YUC9*-Überexpressionslinien beobachtet werden. Während der Wildtyp *A. thaliana* Col-0 nach etwa acht Wochen die Entwicklung abgeschlossen hatte, erreichten einige Überexpressionslinien ein Alter von mehreren Monaten, bevor erste Seneszenz-Erscheinungen sichtbar wurden (ohne Abbildung).
Eine Verknüpfung von ARF2 mit Ethylen ist ebenfalls beschrieben, da die *ARF2*-Überexpression unter Ethylen-Bedingungen die Ausbildung des Hypokotylhakens

inhibiert, während der *ARF2*-Genverlust auch ohne Ethylengabe zu einer verstärkten Ausbildung des Hypokotylhakens führt [220]. Einerseits führt eine Überexpression von *YUC8* bzw. *YUC9* zu dem signifikanten Phänotyp, andererseits entsteht der gleiche Phänotyp bei einer Nullmutation von *ARF2*. Die Beschreibung von ARF2 als Repressor auxinresponsiver Gene [401], die erhöhte ARF2-Induktion in *YUC8*ox (Abb. 3.18) sowie die Gemeinsamkeiten der Phänotypen von *YUC8* bzw. *YUC9*ox und *arf2* deutet möglicherweise auf eine durch eine ARF2-vermittelte Repression der Genexpression für *YUC8* und unter Umständen auch für *YUC9* hin.
Mit Blick auf die Überexpressionsphänotypen und die gewebespezifischen GUS-Analysen hat ARF8 möglicherweise auch eine regulatorische Funktion auf *YUC8* bzw. *YUC9*. So ist ARF8 an der Blütenentwicklung [266] und als negativer Regulator der Fruchtentwicklung beteiligt [137, 395]. Es konnte gezeigt werden, dass ARF8 eine ähnlich parthenokarpe Fruchtentwicklung stimuliert [138], wie sie auch bei *YUC8*ox bzw. *YUC9*ox beobachtet wurde. Zudem ist publiziert, dass erhöhte Auxingehalte die ARF6/ARF8-abhängige Expression des JAZ1-Repressors induzieren, wodurch die COI1-abhängige JA-Signaltransduktion inhibiert wird [146]. Der gesteigerte ARF8-Transkriptgehalt in *YUC8*ox ist daher möglicherweise durch die gesteigerte Auxinbiosynthese bedingt.
In den Analysen zur möglichen Promotorregion für die GUS-Studien konnten auxinresponsive *cis*-Elemente (TGTCTC) [1, 152] innerhalb der Promotorregion von *YUC8* und *YUC9* ermittelt werden, so dass ein regulierender Einfluss durch die ARF-Faktoren möglich wäre. Die Erhöhung der Transkripte von *ARF1*, *ARF2* und *ARF8* deuten auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch die konstitutive *YUC8*-Expression hin, welche eine Repression der *YUC8*-Transkription bewirken könnte. Denkbar wäre, dass dieser Mechanismus durch einen *YUC8*-vermittelten erhöhten Auxingehalt ausgelöst wird. Demnach müssten die hochregulierten ARF-Faktoren an die entsprechenden *cis*-Elemente des *YUC8*-Promotors auf dem Pflanzengenom binden und dadurch eine natürliche Expression unterbleiben.
Da die phänotypischen Interpretationen von Überexpressionslinien durch Nebeneffekte artifizieller Natur sein können, bieten sie lediglich einen Ansatz zur Verifikation mit weiteren Untersuchungsmethoden. Zur Überprüfung, ob die Transkriptionsfaktoren spezifisch an der Promotorregion binden und so zu einer Repression führen, würden sich quantitative Transkriptanalysen mit *arf1*-, *arf2*- und *arf8*-Nullmutanten oder RNA-Interferenz-vermittelte Experimente anbieten. Durch die fehlenden Transkriptionsfaktoren dürfte *YUC8* theoretisch nicht reprimiert sein, so dass vermehrt *YUC8*-Transkripte

nachgewiesen werden könnten. Bestätigt sich die ARF-Hypothese bieten sich Studien zur DNA-Protein-Interaktion der Promotorelemente von *YUC8* bzw. *YUC9* mit den möglichen ARF-Faktoren an, um eventuelle Regulationsmechanismen von *YUC8* und *YUC9* zu analysieren.

4.6 Funktion von *YUC8* und *YUC9* bei der Wurzelentwicklung

Mit Hilfe von Keimlingsanalysen und Wurzelwuchsstudien transgener Überexpressionslinien und Nullmutanten konnten weitere Erkenntnisse über die physiologische Funktion von *YUC8* und *YUC9 in vivo* erhalten werden (3.6). Ein Phänotyp, der besonders das Zusammenspiel von Ethylen und Auxin verdeutlicht, ist die veränderte Wurzelmorphologie in den *YUC8*- und *YUC9*-Überexpressionslinien (Abb. 3.17).
Während das verkürzte Wurzelwachstum einen erhöhten Auxingehalt widerspiegelt, deutet die verstärkte Wurzelbehaarung auf eine Beteiligung von Ethylen hin [29, 388]. Es ist bekannt, dass sowohl die Anzahl als auch die Länge der Wurzelhaare gleichermaßen von der Auxin- und Ethylenmenge beeinflusst werden [118, 238]. Symbiotische Pilze wie beispielsweise Trüffel machen sich diesen Effekt zunutze und beeinflussen bewusst die Auxin- und Ethylenkonzentrationen an der Wurzel, um eine optimale Interaktion durch die vermehrte Wurzelbehaarung und die daraus resultierende Oberflächenvergrößerung zu ermöglichen [362]. Die Wurzelhaarentwicklung in *A. thaliana* wird dabei über das Verhältnis der Repressoren Aux/IAA17 und Aux/IAA3 gesteuert [194, 221]. Aux/IAA17 reprimiert die Wurzelhaarinitiation und -länge, während Aux/IAA3 die Entwicklung fördert. Die ausgeprägte Wurzelhaarentwicklung in *YUC8*ox und *YUC9*ox ist deutlich stärker als bei bereits beschriebenen *YUC*-Überexpressionsmutanten. Dies könnte auf eine Verknüpfung von Aux/IAA17 und der *YUC8*ox/*YUC9*ox-initiierten Auxinsynthese hinweisen. Möglicherweise ist der Auxingehalt in den Wurzeln höher als bei vergleichbaren Auxinüberproduktionsmutanten, was wiederum zu einem vermehrten Abbau der Aux/IAA17-Repressoren und damit zu einer verstärkten Wurzelhaarbildung führen könnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aux/IAA3- und Aux/IAA17-Repressoren nicht nur an der Wurzelhaarentwicklung, sondern auch an der Seitenwurzelbildung beteiligt sind [218, 396].
Die entwicklungsabhängige GUS-Analyse sollte Aufschluss über eine mögliche Funktion im Wurzelgewebe geben (3.9.2). Bereits einen Tag nach Stratifikation zeigte sich sowohl für *YUC8*gus als auch *YUC9*gus eine intensive Promotoraktivität in den Primärwurzelspitzen und später insbesondere für *YUC9*gus in der ganzen Keimlingswurzel (Abb. 3.27). Die Aktivität in den Wurzeln verstärkte sich für *YUC9* in älteren Pflanzen,

während sich die Promotoraktivität von *YUC8*gus auf die Initialbereiche der Lateralwurzeln beschränkte (Abb. 3.28). Die nähere Analyse der Wurzel zeigte, dass sowohl *YUC8* als auch *YUC9* eine Rolle in der Seitenwurzelentwicklung spielen (Abb. 3.29 A und B). Der *YUC9*-Promotor wies kurz vor Auswachsen der Seitenwurzel im Primordiumsbereich eine steigende Aktivität auf, welche sich mit fortschreitender Ausbildung auf die Primärwurzel im Bereich der sich entwickelnden Seitenwurzel deutlich intensivierte. Die Promotoraktivität von *YUC8* begann im sich entwickelnden Zentralzylinder der Lateralwurzel, verstärkte sich dort und blieb auf die auswachsende Seitenwurzel beschränkt.
Die Anlage von Seitenwurzeln ist ein zentraler Punkt bei der Wurzelentwicklung [271]. Die Anzahl der Verzweigungen und die Ausbildung von Wurzelhaaren bedeuten eine Oberflächenvergrößerung zur Aufnahme von Wasser und Nährstoffen und ermöglichen die Verankerung im Boden. Es ist bekannt, dass die Wurzelentwicklung durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Hormone realisiert wird [126]. Dabei spielt neben Cytokinin [209], Abscisinsäure [356] und Ethylen [269] insbesondere Auxin eine tragende Rolle [127]. Neben der entwicklungsgesteuerten Seitenwurzelbildung führen ebenfalls umgebungsbedingte Reize, wie beispielsweise mechanische Stimuli, zu einem lokal erhöhten Auxingradienten und damit zur Ausbildung einer Lateralwurzel [95, 313]. Zudem wurde kürzlich die Förderung der Seitenwurzelbildung durch MeJA aufgezeigt [113]. Möglicherweise führen die mechanischen Stimuli zu einem erhöhten JA-Gehalt, wodurch wiederum die lokale Auxinbiosynthese durch *YUC8* bzw. *YUC9* gesteigert wird. Durch den höheren Auxingehalt kommt es zur Aktivierung mehrerer ARF-Transkriptionsfaktoren [150]. Insbesondere ARF7 und ARF19 werden aktiviert, welche hohe Ähnlichkeiten mit ARF6 und ARF8 aufweisen und eine tragende Rolle bei der Anlage von Seitenwurzeln spielen [276, 438]. ARF7 and ARF19 werden hauptsächlich in vegetativen und proliferierenden Organen exprimiert, während ARF6 und ARF8 besonders an der Blütenentwicklung beteiligt sind [385]. Interessanterweise zeigten Analysen unter Verwendung der Genevestigator-Datenbank [167] in zwei unabhängigen *arf7/arf19*-Nullmutanten eine mehr als dreifache Hochregulation von *YUC9*, während die *YUC8*-Transkripte auf die Hälfe herunter reguliert werden. Dies deutet auf eine unterschiedliche Steuerung von *YUC8* und *YUC9 in planta* hin.
Die GUS-Studien zeigten, dass die *YUC9*-Promotoraktivität in Bereich der Initialstellen von Seitenwurzeln beginnt, wodurch eine lokal erhöhte Auxinkonzentration anzunehmen ist. Der Anstieg des Auxingehalts resultiert wiederum in einer Aktivierung von ARF7 und ARF19 und damit in der Initiation von Seitenwurzeln [278]. Durch das

Fehlen von ARF7 und ARF19 in der *arf7/arf19*-Nullmutante können keine Seitenwurzeln mehr gebildet werden. Offensichtlich versuchen pflanzliche Regelmechanismen, durch Erhöhung der *YUC9*-Transkripte, und damit der lokalen Auxinproduktion in den anzulegenden Seitenwurzelprimordien, eine Aktivierung von ARF7 und ARF19 in *arf7/arf19* zu fördern. Da die Seitenwurzelbildung insbesondere von dem Konzentrationsgefälle zum Nachbargewebe abhängt, könnte gleichzeitig eine Repression von *YUC8* erfolgen, da die *YUC8*-Promotoraktivität innerhalb neu gebildeter Seitenwurzeln aktiv ist und in dem Fall nicht zur Wurzelinitiation über ARF7 und ARF19 beitragen würde. Diese Hypothese könnte durch Kreuzung einer *arf7/arf19*-Nullmutante mit einer DR5-Promotor-GUS-Reportergenlinie analysiert werden. Bei DR5 handelt es sich um einen synthetisch hergestellten Promotor, welcher aus mehreren auxinresponsiven Elementen besteht und durch Auxin aktiviert wird [409]. Anzunehmen wäre ein erhöhter *YUC9*-Transkriptgehalt in bestimmten Wurzelbereichen und eine daraus folgende lokal gesteigerte Auxinkonzentration, welche mittels der DR5-GUS-Fusion angezeigt würde. Zudem kann der Nachweis ortsspezifischer *YUC9*-Transkripte mit Hilfe von RNA-*In-situ*-Hybridisierungen überprüft werden, wodurch genspezifische Nukleinsäure-Sequenzen in ihrer zellulären Umgebung visualisiert werden [164].
Während die Überexpression von *YUC8* bzw. *YUC9* ein deutlich verkürztes Wurzelwachstum, eine höhere Seitenwurzeldichte sowie längere Hypokotyle und Petiolen (Abb. 3.20) bewirkte, zeigte sich der gegenteilige Effekt in den Nullmutanten durch kürzere Hypokotyle und Petiolen. Dass *YUC8* und *YUC9* offenbar eine Funktion bei der Ausbildung von Lateralwurzeln haben, bestätigt die geringere Anzahl der Seitenwurzeln bzw. die geringe Seitenwurzeldichte in den Nullmutanten (Abb. 3.20 B und D). Dabei waren die Ausprägungen in der Doppelmutante *yuc8/yuc9* geringfügig stärker als in den Einzelmutanten, was auf einen additiven Effekt hinweist.
Besonders interessant waren die Unterschiede der Funktionsmutanten auf MeJA-supplementiertem Medium (Abb. 3.19 und 3.20 A). Während der Wildtyp Col-0 ein deutlich verkürztes Wurzelwachstum aufzeigte, reagierten die Nullmutanten weniger sensitiv auf MeJA. Die *yuc9*-Nullmutante reagierte dabei weniger sensitiv als *yuc8*. Die Doppelmutante zeigte einen additiven Effekt der beiden Einzelmutanten auf. So war die Primärwurzellänge von *yuc8/yuc9* mehr als doppelt so lang im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Diese Beobachtung lässt sich auf das Zusammenspiel von JA und Auxin zurückführen. Neben den bekannten Signal- und Transportmechanismen [290] ist noch wenig über die *De-Novo*-Synthese von Auxin in den sich entwickelnden Seitenwurzeln bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass JA durch Induktion der an der Trp-

Synthese beteiligten Gene *ASA1* und *ASB1* den Trp-Gehalt steigert und die JA-Gabe ebenfalls einen erhöhten Auxingehalt bewirkt [91, 382]. Als negative Rückkopplung wirken hohe Trp-Gehalte wiederum reprimierend auf die Expression von *ASA1* und *ASB1* [96]. Zudem bewirken höhere Trp-Konzentrationen eine vermehrte Konjugatbildung zu beispielsweise JA-Trp und IES-Trp, welche in Wurzeln einen hemmenden Einfluss auf die durch Trp induzierte Auxinantwort ausüben [368, 369].
Einerseits wirken die auf MeJA-haltigem Medium erhöhten JA-Gehalte durch Suppression der Mitoseaktivität negativ auf das Längenwachstum [454]. Andererseits können die durch JA gesteigerten Auxingehalte eine Inhibierung der Wurzellänge verursachen, so dass ein synergistischer Effekt zur Inhibierung des Längenwachstums erreicht wird. In geringen Konzentrationen wirkt Auxin wachstumsfördernd und in höheren Dosen wachstumshemmend, wobei dies gewebespezifisch ist [392]. So zeigen Wurzeln bereits eine Hemmung des Wachstums bei Auxinkonzentrationen, bei denen die Zellelongation im Spross deutlich gefördert wird (Abb. 4.2). Dies entspricht auch den Phänotypen von *YUC8*ox und *YUC9*ox mit den deutlich verkürzten Wurzeln (Abb. 3.20 A blau) im Vergleich zum ausgeprägten Längenwachstum der Primärtriebe (Abb. 3.13). Die weniger sensitiven *yuc8*- und *yuc9*-Nullmutanten und die Doppelmutante *yuc8/yuc9* deuten darauf hin, dass *YUC8* und *YUC9* eine redundante Funktion in dieser Signalkette einnehmen. Durch den doppelten Genverlust in *yuc8/yuc9* kann weniger JA-induziertes Auxin über *YUC9* und redundant über *YUC8* synthetisiert werden, wodurch die Auxinkonzentrationen in den Nullmutanten geringer sind als im Wildtyp und dadurch die Wurzeln weniger stark im Wachstum gehemmt werden. *YUC8*ox und *YUC9*ox zeigten auf MeJA-haltigem Medium verglichen mit den anderen Linien eine geringere Abnahme der relativen Wurzellänge. Ohne Zusatz hatten die Linien etwa 40 % der Wurzellänge vom Wildtyp. Mit MeJA ist das Verhältnis auf über 75 % angestiegen. Die konstitutiven Überexpressionslinien reagierten demnach weniger sensitiv als der Wildtyp. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die JA-induzierte Auxinsynthese einen geringeren Einfluss auf die Überexpressionslinien hat, da *YUC8* bzw. *YUC9* bereits konstitutiv überexprimiert werden und die relative Zunahme des Auxingehalts weniger stark ist als im Wildtyp.
Einen ähnlichen Effekt zeigten die Wurzelwuchsstudien mit supplementierten IES-Medien (Abb. 3.21). Steigende Mengen an IES (Auxin) bewirkten eine Anpassung der Wurzellänge bei den Wildtyp- und Überexpressionspflanzen. Das lässt sich dadurch erklären, dass *YUC8*ox bzw. *YUC9*ox zu einem basal höheren Auxingehalt führen. Durch externe Zugabe von geringen Mengen Auxin war der Einfluss der überexpressionsbe-

dingten Auxinmenge noch größer. In höheren Dosen war diese jedoch vernachlässigbar, so dass die externe IES-Zugabe in Wildtyp und Überexpressionslinien zu einem annähernd gleichen Auxingehalt führte und daher eine gleichmäßige Hemmung des Wurzelwachstums zu sehen war.

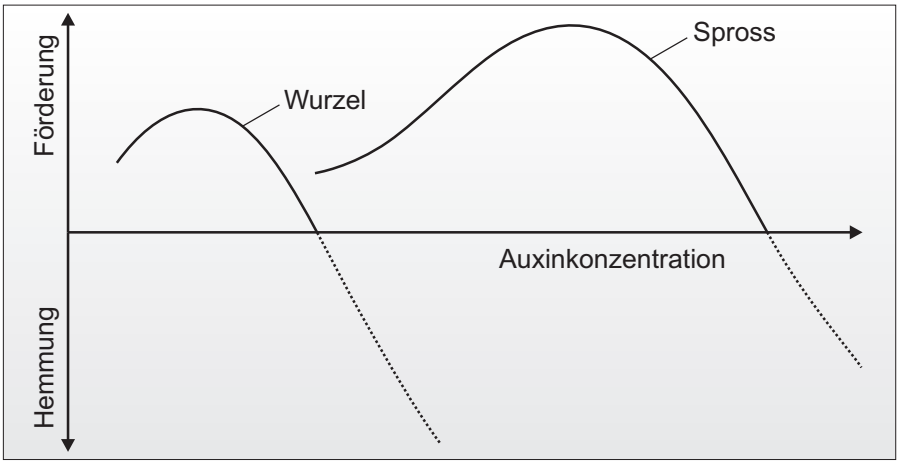


Abb. 4.2: Zusammenhang von Auxindosis und Auxinwirkung in Wurzeln und Sprossen
Schematisch dargestellt ist die Förderung bzw. Hemmung des Zellstreckungswachstums von Wurzeln und Sprossen in Abhängigkeit von der Auxinkonzentration. Abbildung nach SITTE *et al.* [354].

In den Primärwurzelspitzen nahm die Aktivität mit zunehmendem Alter der Pflanzen ab, während sie in den Lateralwurzelspitzen anstieg (Abb. 3.29 D und F). Die Beobachtungen lassen sich mit einem Einfluss von *YUC8* und *YUC9* auf die allgemeine Wurzelbildung von *A. thaliana* erklären. Dabei würden beide durch die Bereitstellung von Auxin einen Einfluss auf das differentielle Längenwachstum der Wurzel nehmen. *A. thaliana* verfügt als dikotyle Pflanze über ein heterogenes Wurzelsystem mit einer gravitrop wachsenden Hauptwurzel und seitlich von ihr abzweigenden Lateralwurzeln. Als Flachwurzler wird dabei die Wachstumsaktivität der Primärwurzel nach einiger Zeit eingestellt, während sich die Lateralwurzeln verstärkt entwickeln und eine ungefähr identische Wurzellänge erreichen (vgl. Abb. 3.28) [354]. Dies korreliert mit der entwicklungsabhängigen Promotoraktivität von *YUC8* und *YUC9* in den Wurzelspitzen. Die Analyse der Primär- und Seitenwurzellänge sowie des vollständig entwickelten Wurzelsystems von *yuc8/yuc9* im Vergleich zum Wildtyp wird derzeit untersucht und würde die Relevanz von *YUC8* und *YUC9* in diesem Prozess aufzeigen.
In jungen Keimlingen war eine ausgeprägte *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität in den Primärwurzelspitzen zu beobachten. *YUC8*gus zeigte dabei besonders im meristemati-

schen Bereich und in der Columella eine Aktivität, während sich die *GUS*-Expression bei *YUC9*gus hauptsächlich auf den meristematischen Bereich beschränkte (Abb. 3.29 C und E). Die spezifische Auxinsynthese in der Columella deutet auf einen möglichen Einfluss von *YUC8* beim Gravitropismus hin, da sich die dafür erforderliche Statolithenstärke in den Statocyten der Columella befindet [329]. Aufgrund der spezifischen *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität in den Wurzeln wurde das gravitrope Reaktionsverhalten von Überexpressionslinien und der Doppelmutante untersucht. Pflanzen sind in der Lage, ihre Organe durch Wachstumskrümmung in eine bestimmte Richtung zur Erdanziehung zu orientieren. Die Perzeption der Gravitationsreize in den Wurzelspitzen funktioniert dabei über die Verlagerung der Statolithenstärke, wodurch die Primärwurzel in Richtung Erdmittelpunkt wächst [255, 308]. Die daraus resultierenden veränderten Auxintransportmechanismen verursachen das dafür erforderliche einseitige Wurzelwachstum. Neben dem Auxintransport [282] und weiteren Phytohormonen [153] spielt aber offensichtlich auch die Auxinsynthese vor Ort eine Rolle für den Gravitropismus [272]. Die Abbildung 3.22 zeigt, dass der Genverlust von *yuc8/yuc9* leichte Schwankungen beim gravitropen Wachstum 24 Stunden nach Neu-Orientierung bewirkt. Denkbar wäre, dass die unterschiedlichen Auxinkonzentrationen durch die fehlende YUC8- bzw. YUC9-bedingte Auxinsynthese nicht entsprechend schnell angepasst werden können, um ein gezielt gravitropes Wachstum nach 24 Stunden zu ermöglichen. Die Inaktivierung von *YUC8* und *YUC9* in *yuc8/yuc9* könnte aber auch durch die möglicherweise geringeren Auxingehalte in den Wurzelspitzen das leicht veränderte gravitrope Wuchsverhalten erklären (Abb. 3.22).

Die Beobachtungen der Funktionsmutanten und GUS-Analysen unterstreichen eine physiologische Bedeutung von *YUC8* und *YUC9* in der Wurzel. Mit der spezifischen Lokalisation der *YUC8*- und *YUC9*-Promotoraktivität wurde eine Notwendigkeit der lokalen Auxinbiosynthese in den Wachstumsbereichen der Wurzel gezeigt. Es ist anzunehmen, dass *YUC8* und *YUC9* entwicklungsspezifisch reguliert werden, um eine Erhöhung der lokalen Auxinkonzentration zu bewirken und dadurch die Seitenwurzelbildung durch Initiation und Zellstreckung zu fördern. Da die Doppelmutante *yuc8/yuc9* jedoch eine nur etwas geringere Anzahl an Seitenwurzeln aufwies (Abb. 3.20 B und D) und sich das gravitrope Wurzelwachstum nach 48 Stunden nicht mehr vom Wildtyp unterschied, spielen *YUC8* und *YUC9* zwar eine Rolle bei der Wurzelentwicklung, sind dafür aber nicht essentiell. Es ist von einer Beteiligung weiterer, redundant agierender *YUC*-Gene auszugehen. So zeigten phylogenetische Studien, dass *YUC5*, *YUC8* und *YUC9* in der selben Klade sind [63] und *YUC5* hauptsächlich in Wurzeln aktiv ist [442]. Bisher wurden

keine Auffälligkeiten bezüglich des Wurzelwuchsverhaltens von *yuc5*-Nullmutanten berichtet. Interessant wäre die Untersuchung einer *yuc5/yuc8/yuc9*-Dreifachmutante. Da in dieser Nullmutante die wurzelspezifischen *YUC*-Mitglieder inaktiviert sind und sich daher nicht mehr redundant ersetzen können, wäre eine signifikant veränderte Wurzelentwicklung zu erwarten.

4.7 *YUC8*- und *YUC9*-abhängige Auxinbiosynthese

Die bisherigen Analysen zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Überexpression von *YUC8* bzw. *YUC9* und einer daraus resultierenden Auxinüberproduktion. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analysen bestätigten den gesteigerten Auxingehalt in unterschiedlichen Überexpressionslinien (Abb. 3.23). Der Anteil der freien IES gibt dabei die physiologisch aktive Form des Auxins an. Neben der *De-novo*-Synthese, Import und Export sowie oxidativem Abbau von Auxin bieten insbesondere die Konjugation und Dekonjugation eine Möglichkeit zur Modulation des zellulären Auxingehalts [227]. Da konjugierte Auxinderivate eine physiologisch inaktive, aber reaktivierbare Form darstellen, wurden auch die Gesamt-Auxinkonjugate analysiert. Interessanterweise zeigten die *YUC8*ox-Linien deutlich mehr Anteile an konjugierter IES als *YUC9*ox-Linien. Möglicherweise ist die Auxinsynthese in *YUC8*ox stärker ausgeprägt. Um dem entgegenzuwirken, könnten in *YUC8*ox gesteigerte Konjugationsmechanismen die freie IES durch Konjugation inaktivieren, so dass dadurch der Anteil an freier IES nicht mehr als 200 % vom Wildtypgehalt erreicht. In *YUC9*ox sind die Überexpressionsphänotypen ähnlich zu *YUC8*ox, da nur die freie IES die Entwicklung steuert und sich diese Gehalte ähneln. Anzunehmen wäre, dass bei weiterer Steigerung der Auxinbiosynthese in *YUC9*ox auch die Menge an konjugierter IES ähnlich wie bei *YUC8*ox zunehmen würde.

Ein Kernpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Octadecanoid-induzierten Auxinbiosynthese. Es konnte bereits eine spezifische *YUC8*- und *YUC9*-Transkriptänderung nach Octadecanoid-Induktion nachgewiesen werden (3.2.2). Mit Hilfe der funktionellen Nullmutanten waren zudem erweiterte Studien zur induzierten Auxinbiosynthese möglich, um den Anteil von *YUC8* und *YUC9* daran zu bestimmen. Hierfür wurde der Auxingehalt in Keimlingen, aufgetrennt in Kotyledonen, Hypokotyl und Wurzel, nach Induktion mit MeJA im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bestimmt. Die nicht induzierten Nullmutanten *yuc8* und *yuc9* zeigten in den verschiedenen Geweben unterschiedliche IES-Defizite im Vergleich zum Col-0-Wildtyp (Abb. 3.24 blau). In der *yuc8/yuc9*-Doppelmutante äußerten sich die niedrigere IES-Gehalt der beiden Einzel-

mutanten als additiver Effekt, was auf eine eingeständige Funktion von *YUC8* und *YUC9* unter nicht induzierenden Bedingungen hindeutet. Die niedrigeren IES-Gehalte in den Nullmutanten zeigten sich phänotypisch für die Wurzeln in der Anzahl der Seitenwurzeln (Abb. 3.20 B) und für die Hypokotyle anhand der geringeren Hypokotyllänge (Abb. 3.20 C). Die Keimblätter wurden nicht vermessen jedoch wiesen die Nullmutanten eine niedrigere Petioluslänge auf (Abb. 3.20 C). Die milden phänotypischen Ausprägungen lassen sich durch die Auxinwirkweise erklären. Für eine morphologische Veränderung kommt es nicht zwingend auf die absolute Menge sondern besonders auf das Auxinverhältnis an [86, 355]. Möglicherweise bewirkt der niedrigere IES-Gehalt eine Anpassung anderer Signalwege [29, 43], so dass ein ausgeglichenes Phytohormonverhältnis angestrebt und dadurch eine weitestgehend normale Entwicklung gewährleistet wird.
Die MeJA-Induktion der Keimlinge führte in allen Geweben zu einer deutlichen Zunahme der Auxingehalte (Abb. 3.24 rot). Um diese MeJA-induzierte Auxinsynthese im Vergleich zur Kontrolle besser darzustellen, wurde die Menge der neu gebildeten IES relativ zum Wildtyp Col-0 gesetzt (Abb. 3.25). In den Kotyledonen zeigte sich, dass der Genverlust von *YUC8* bzw. *YUC9* einen nicht signifikanten Einfluss auf die JA-abhängige Auxinsynthese hatte. Hingegen bewirkte die Nullmutation beider Gene in *yuc8/yuc9* eine deutlich Abnahme von über 80 %. Einen ähnlichen Effekt wiesen die Hypokotyle auf, wobei *yuc8* schon eine geringere Auxinantwort zeigte, jedoch in Kombination mit *yuc9* die Syntheserate um knapp 70 % reduziert wurde. Mit diesem Versuch konnte erstmalig gezeigt werden, dass die JA-induzierte Auxinbiosynthese in *A. thaliana* größtenteils durch *YUC9* und im Falle der *yuc9*-Nullmutation redundant durch *YUC8* gewährleistet wird. So ersetzen sich beide Gene unter JA-induzierenden Bedingungen in den Kotyledonen und Hypokotylsegmenten, da der maximale Effekt erst in der Doppelmutante *yuc8/yuc9* erreicht wurde. In den Wurzeln zeigte bereits ein einzelner Genverlust eine Verringerung der JA-induzierten Auxinsynthese um etwa 40 % bzw. 55 % und in *yuc8/yuc9* um 60 %. Die Redundanz scheint hier weniger stark ausgeprägt zu sein, was möglicherweise für eine jeweils unterschiedliche Funktion im Wurzelgewebe spricht.
Die GUS- und Transkriptanalysen zeigten eine primäre Funktion von *YUC9* in der Octadecanoid-Induzierbarkeit. Interessanterweise zeigte sich unter kontinuierlichen MeJA-Induktionsbedingungen, neben einer erwartungsgemäß starken Aktivierung des *YUC9*-Promotors (Abb. 3.35 D), auch eine leichte Steigerung der *YUC8*-Promotoraktivität (Abb. 3.35 B). Die IES-Messungen mit den Nullmutanten *yuc8*, *yuc9* und *yuc8/yuc9* wie-

sen ein redundantes Verhalten bezüglich der MeJA-bedingten Steigerung des Auxingehalts auf. Mehr Aufschluss über das redundante Verhalten von *YUC8* bei Ausfall von *YUC9* würde die Kreuzung von *YUC8*gus mit *yuc9* ergeben. Aufgrund des *YUC9*-Funktionsverlusts wäre eine gesteigerte MeJA-Induzierbarkeit des *YUC8*-Promotors und eine *YUC8*-Promotoraktivität nach Verwundung (vgl. Abb. 3.36) zu erwarten.
Die Tatsache, dass in den Geweben der Doppelmutante *yuc8/yuc9* dennoch eine schwache JA-abhängige Auxinantwort gemessen wurde, deutet auf weitere redundant agierende Auxinbiosynthesegene hin. Quantitative Transkriptanalysen der induzierten Nullmutanten würden eine Identifizierung anderer hochregulierter Gene ermöglichen. Die identifizierten Gene könnten als Mehrfach-Mutante mit *yuc8/yuc9* gekreuzt werden, um die Octadecanoid-induzierte Biosynthese, sofern dadurch keine letalen Begleiterscheinungen auftreten, komplett zu inaktivieren und eine von Auxin entkoppelte JA-Antwort analysieren zu können. Die phänotypische Analyse der Funktionsmutante und deren Verhalten auf abiotische und insbesondere biotische Faktoren würden weitere Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung der durch JA beeinflussten Auxingehalte und den von Auxin isolierten JA-Effekt ermöglichen. Dies würde wiederum Rückschlüsse auf die Bedeutung von Auxin beispielsweise bei der Pathogenabwehr und Wundantwort erlauben.

4.8 Fazit

Durch ihre Schlüsselposition in der Auxinbiosynthese und ihre Regulation durch andere Phytohormone, spielen *YUC*-Mitglieder möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der Interaktion mehrerer Signaltransduktionswege und damit der intraspezifischen Kommunikation in Pflanzen. Die Studien dieser Arbeit zeigten teilweise redundante aber auch unterschiedliche Funktionen von *YUC8* und *YUC9*. Beide Genprodukte führen zu einer gesteigerten Auxinbiosynthese. *YUC8* deutet möglicherweise auf eine Funktion in der Ethylen-induzierten Auxinbiosynthese hin, während *YUC9* insbesondere eine Rolle in der Octadecanoid-induzierten Auxinbiosynthese spielt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass beide Gene bzw. Genprodukte auch im entsprechenden anderen Signalweg redundant involviert sind und induziert werden können. In der hier vorgestellten Arbeit wurde auf ein kooperatives Zusammenspiel von Octadecanoiden, Auxin und Ethylen eingegangen. Es wurde ersichtlich, dass *YUC8* und *YUC9* eine mögliche Verknüpfungsstelle zwischen diesen Phytohormonen darstellen. Die Daten zeigten eine physiologische Funktion von *YUC8* und *YUC9* bei der Wurzelentwicklung sowie der Blüten- und Samenbildung. Zudem konnte gezeigt werden, dass insbesondere

YUC9 durch JA und Verwundung hochreguliert wird. Eine mögliche Beteiligung von *YUC9* an der pflanzlichen Wundreaktion wurde dargestellt. Möglicherweise spielt eine verwundungsinduzierte und *YUC9*-vermittelte Auxinsteigerung eine Funktion für Zellproliferationsprozesse in den verletzten Geweben. Die Verknüpfung mit Ethylen und der erhöhte Lignifizierungsgrad könnte möglicherweise auch eine Rolle bei der Pathogenabwehr durch Stabilisation der Zellwände spielen. Weiterhin wurde ein synergistisches Verhalten von JA und Auxin über *YUC9* bei der Wurzelentwicklung diskutiert. Mögliche Stressbedingungen beim Wurzelwachstum führen zu erhöhten JA-Gehalten, welche zu einer Inhibierung der Mitoseaktivität führen. Gleichzeitig bedingt eine JA-induzierte *YUC9*-Expression höhere Auxingehalte, die wiederum negativ auf die Zellstreckung wirken. In Summe verursacht das synergistische Zusammenspiel von JA und Auxin eine Hemmung des Wurzelwachstums, um entsprechend auf Stressbedingungen zu reagieren. Die hier diskutierte Einordnung von *YUC8* und *YUC9* in den Octadecanoid-induzierten Auxinbiosynthesweg sowie deren molekulare Mechanismen zur eigenen Regulation und die Beteiligung an den pflanzlichen Entwicklungsprozessen fasst die Abbildung 4.3 zusammen.

Die Reichweite der durch Auxin beeinflussten phänotypischen Eigenschaften lässt sich mit den unterschiedlichen Expressionsmustern von Aux/IAA-Repressoren, ARF-Transkriptionsfaktoren, Biosynthesegenen, Transport- sowie unterschiedlichen Abbaumechanismen erklären. Bei der pflanzlichen Entwicklung spielen hierbei insbesondere der polare Auxintransport und die lokale Auxinbiosynthese eine tragende Rolle. Der gezielte Auxintransport wird über die membranständigen Auxin-Exportproteine PIN („pin-formed“) [24, 122] und die Auxin-Importproteine AUX/LAX („auxin 1“/„like auxin 1“) [25, 384], welche bei der Wurzelentwicklung eine wichtige Rolle spielen, gewährleistet. Dabei wird besonders durch die intrazellulär veränderbare Re-Lokalisation der PIN- bzw. AUX-Proteine die Auxin-Transportrichtung bestimmt [93, 131]. Interessanterweise interagieren Auxintransport und -biosynthese synergistisch. So wurde gezeigt, dass die Nullmutanten von *yuc1/yuc4* und *pin1* einen geringen Einfluss auf die Blattbildung nehmen [63, 129]. Die *yuc1/yuc4/pin1*-Dreifachmutante wies hingegen massive Einschränkungen bei der Blatt- und Blütenentwicklung auf [65]. Dieser Phänotyp wurde in der Form weder in *pin1* noch in *yuc1/yuc4* beobachtet. Ebenso zeigte die Nullmutation des Auxin-Importers AUX1 keinen auffälligen Blattphänotyp. Die Kombination von *aux1* mit der *yuc1/yuc2/yuc4/yuc6*-Vierfachmutante führte jedoch zu dem gleichen Phänotyp wie er bei *yuc1/yuc4/pin1* beobachtet wurde [65]. Daraus lässt sich ableiten, dass die gezielte Auxinsynthese durch die YUC-Flavin-Monooxygenasen und gleichzeitig

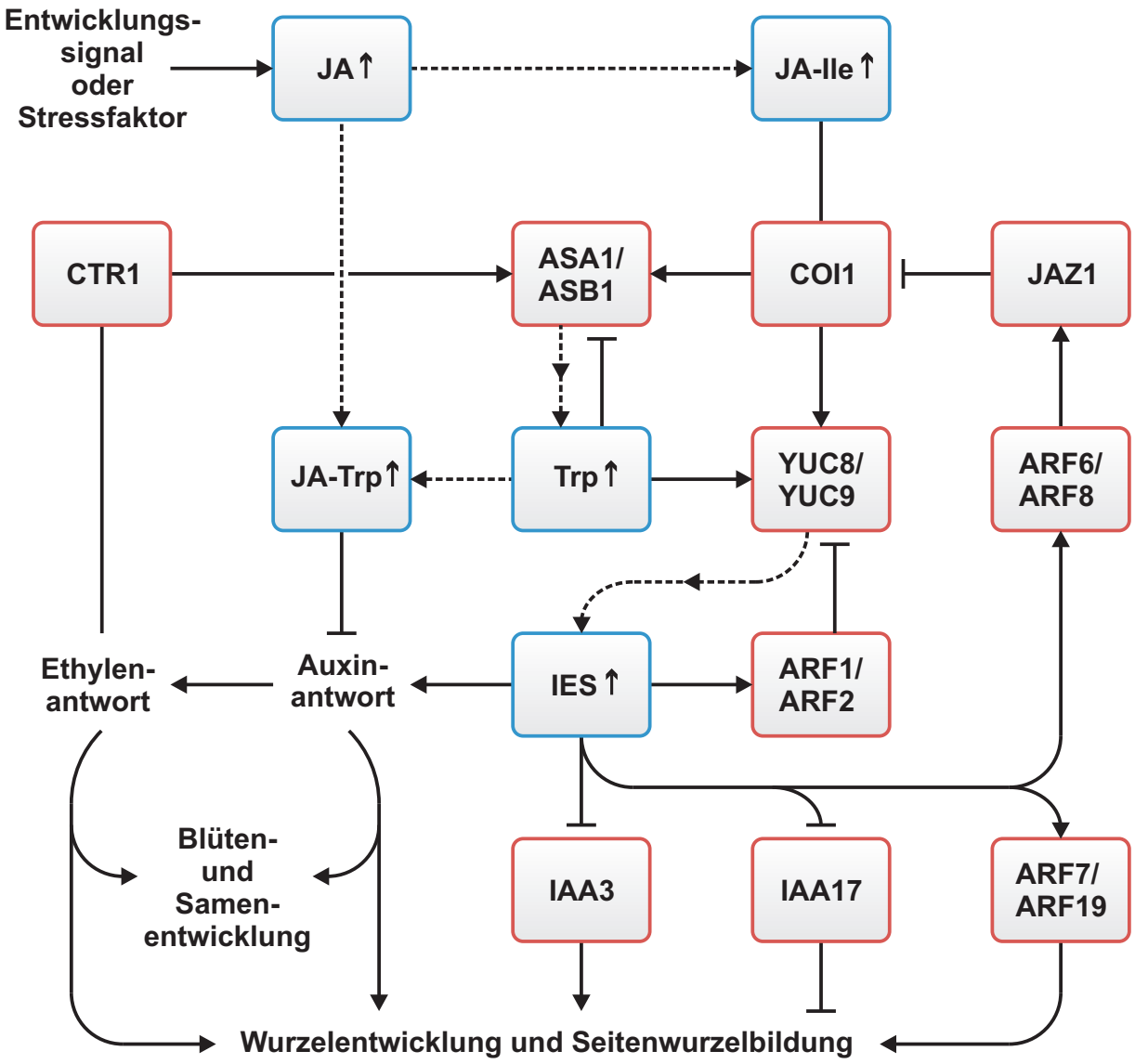


Abb. 4.3: Molekulare Mechanismen von *YUC8* und *YUC9* in *A. thaliana*
Dargestellt ist die mögliche Signalkaskade zur Regulation von *YUC8* und *YUC9* sowie deren Einfluss auf pflanzliche Entwicklungsschritte. [durchgehende Linien - Förderung (Pfeil) oder Hemmung (Balken), gestrichelte Linien - Biosynthesereaktion, blaue Boxen - Metabolite, rote Boxen - Proteine; ARF - auxinresponsive Transkriptionsfaktoren, ASA1/ASB1 - Anthranilatsynthasen, COI1 - JA-Rezeptor, CTR1 - Serin-Threonin-Kinase, IAA - Aux/IAA-Faktoren, IES - Indol-3-essigsäure (Auxin), JA - Jasmonsäure, JA-Ile - (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucin, JA-Trp - Jasmonsäure-Tryptophan-Konjugat, JAZ1 - Repressor JA-responsiver Gene, Trp - L-Tryptophan, YUC - Flavin-Monooxygenase-ähnliche YUCCA-Proteine]

der gerichtete Auxintransport durch die PIN- bzw. AUX-Transporter für die pflanzliche Entwicklung zwingend erforderlich sind.
Die genaue Erforschung dieser synergistischen Steuerungsmechanismen stellt eine Herausforderung dar, da sowohl die Mitglieder der PIN- als auch der YUC-Familie überlappenden Funktionen übernehmen [63, 129]. Ferner beeinflussen die geänderten Auxinkonzentrationen die Regulation der *PIN*-Gene auf transkriptioneller Ebene und wirken gleichzeitig auf den intrazellulären Vesikeltransport, welcher wichtig für eine korrekte Ausrichtung der PIN-Proteine ist [280, 419]. Zudem wurde in dieser Arbeit über die weitreichenden Regulationsmöglichkeiten von *YUC*-Mitgliedern am Beispiel von *YUC8* und *YUC9* berichtet.
Durch das in dieser Arbeit aufgezeigte redundante Verhalten ist eine genaue Trennung von *YUC8* und *YUC9* innerhalb der dargestellten Signalkaskade (Abb. 4.3) nur schwer möglich. Die Analyse der beschriebenen Transkriptionsfaktoren, welche möglicherweise an der Regulation der beiden Gene sowie deren physiologischer Antwort beteiligt sind, würde einen tieferen Einblick erlauben. Neben den bereits angesprochenen genetischen und molekularbiologischen Untersuchungsmöglichkeiten könnten zudem vorwärts gerichtete genetische Studien neue Komponenten aufdecken. Hierbei würden beispielsweise nach Mutagenese von *YUC9*gus mutierte Linien charakterisiert werden, welche keine Induktion nach Octadecanoid-Behandlung aufweisen. Die Charakterisierung der mutierten Gene könnte damit Aufschluss über den Signalweg vom Induktor zur spezifischen Induktion der Genexpression geben. Weiterhin würde die Untersuchung des Transkriptoms, Proteoms und Metaboloms [123] der induzierten *yuc8*-, *yuc9* bzw. *yuc8/yuc9*-Nullmutanten neue Erkenntnisse über andere beteiligte Signalkaskaden erlauben. Sofern es mit den beschriebenen Optionen möglich sein sollte, zukünftig YUC-Proteine funktionell zu produzieren, wäre außerdem eine enzymatische Charakterisierung erstrebenswert, um die Schlüsselreaktion der Auxinbiosynthese aufzudecken. Zudem wären mit einem funktionalen Expressionssystem DNA-Protein- sowie Protein-Protein-Interaktionsstudien zur Identifikation beteiligter Interaktoren möglich.
Anhand der in dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse wird ersichtlich, dass die pflanzlichen Steuerungsmechanismen deutlich komplexer sind als bisher angenommen. Das Phytohormon Auxin wirkt nicht als geschlossenes System, sondern beeinflusst andere Phytohormonsignalwege und wird ebenfalls durch andere Signalwege beeinflusst. Dabei wird die Signaltransduktion über dutzende Transkriptionsfaktoren gewährleistet, welche wiederum andere Synthesewege reprimieren oder aktivieren. Die redundante Steuerung der Biosynthesegene als auch deren Transkriptionsfaktoren und Abbau-

mechanismen erweitern die möglichen Regulationswege beträchtlich. Zudem weisen jüngste Studien auf einen zusätzlichen Regelmechanismus durch MicroRNA-Elemente hin [225, 241, 327], wodurch das Spektrum pflanzlicher Steuerungsprozesse neue Dimensionen erreicht. Die vielfältigen Wechselwirkungen ermöglichen dabei bisher unbekannte Synergie-Effekte zur Feinsteuerung der pflanzlichen Entwicklung und der Reaktion auf ihre Umwelt.
Nach der vollständigen Sequenzierung des *A.-thaliana*-Genoms im Jahr 2000 war es das ehrgeizige Ziel der internationalen „Arabidopsis Genome Initiative“ (AGI), alle Genfunktionen bis zum Jahr 2010 verstanden zu haben („Mission Statement Arabidopsis 2010: To exploit the revolution in plant genomics by understanding the function of all genes of a reference species within their cellular, organismal, and evolutionary context.“). Die *Arabidopsis*-Forschung sollte und soll dabei grundlegende Einblicke in die zelluläre und molekulare Funktionsweise von Schlüsselgenen in den Pflanzen allgemein erlauben. Im letzten Jahrzehnt wurden viele Erkenntnisse über die pflanzlichen Stoffwechsel- und Entwicklungsprozesse gewonnen, woraus sich wiederum spannende neue Fragestellungen eröffnet haben. Die vorliegende Arbeit wurde 2010 beendet und hat einen Beitrag zur Aufklärung der zwei *Arabidopsis*-Gene *YUC8* und *YUC9* geleistet sowie deren Einfluss und mögliche Funktion *in planta* untersucht. Bis zu einem vollständigen Verständnis aller Gene und deren physiologischer Funktion allein in *A. thaliana* wird es jedoch noch viele Jahrzehnte brauchen. Für die Grundlagenforschung ist dies eine bedeutende Nachricht und bietet genügend Ansätze für eine freie Forschung. Die industrialisierte Verwendung gentechnisch veränderter Pflanzen sollte jedoch, aufgrund der umfangreichen und bisher wenig verstandenen Kreuzreaktionen innerhalb der Pflanze als auch insbesondere mit deren Umwelt, im Vorfeld durchdacht werden. Für eine objektive Abwägung möglicher Risiken und Nutzen ist daher eine intensive Forschung zum besseren Verständnis pflanzlicher Entwicklungsprozesse essentiell und zukunftsweisend.

5 Zusammenfassung

Auxine, mit der Indol-3-essigsäure (IES, Auxin) als Hauptvertreter, sind als wachstumsfördernde Phytohormone an nahezu allen pflanzlichen Entwicklungsprozessen beteiligt. Die Phytohormongruppe der Octadecanoide spielt mit der Jasmonsäure (JA) und deren Vorstufe 12-Oxophytodiensäure (OPDA) insbesondere eine Rolle bei der pflanzlichen Stressantwort. In jüngster Zeit mehrten sich die Hinweise, dass diese Phytohormongruppen synergistische Wirkspektren aufweisen. Eine direkte Verknüpfung zwischen den Octadecanoiden und Auxin war jedoch bisher wenig bekannt. In Studien mit einer JA- und OPDA-defizienten Nullmutante konnten die beiden Gene *YUC8* und *YUC9* aus dem pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* als Octadecanoid-induzierbar identifiziert werden. Aufgrund bereits beschriebener *YUC*-homologer Gene wurde eine Funktion innerhalb der Auxinbiosynthese vermutet.
Zur Aufklärung der Octadecanoid-induzierten Auxinbiosynthese erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Charakterisierung von *YUC8* und *YUC9* anhand genetischer und molekularbiologischer Studien. Für die Analysen wurden stabile Überexpressionsmutanten mittels dreier verschiedener Expressionssysteme erstellt. Zudem wurden transgene Promotor-GUS-Reportergenlinien analysiert sowie die physiologischen Auswirkungen des Genverlusts in Nullmutanten untersucht.
Gaschromatographisch-massenspektrometrische und phänotypische Untersuchungen der Überexpressionslinien bestätigten eine durch *YUC8* und *YUC9* gesteigerte Auxinbiosynthese in *A. thaliana*. Die Überexpression von *YUC8* und *YUC9* bewirkte auch in anderen Pflanzenspezies einen typischen Auxinüberproduktionsphänotyp, was auf einen konservierten Reaktionsmechanismus hindeutet. Zudem konnte gezeigt werden, dass beide Gene in einem Tryptophan-abhängigen Auxinsyntheseweg involviert sind.
Quantitative Transkriptanalysen und Promotor-GUS-Reportergen-Linien zeigten eine COI1-abhängige Induktion von *YUC9* durch Methyljasmonsäure (MeJA), Coronatin und geringfügig durch OPDA. Zudem ließ sich *YUC9* durch Verwundung induzieren. Der Auxingehalt ließ sich in Wildtyppflanzen durch MeJA-Gabe steigern. Dabei war der Anstieg in den *yuc8*- und *yuc9*-Einzel-Nullmutanten geringfügig eingeschränkt. In der *yuc8/yuc9*-Doppel-Nullmutante zeigte sich jedoch ein deutlich abgeschwächter Auxinanstieg, was auf eine funktionelle Redundanz von *YUC8* und *YUC9* innerhalb der MeJA-induzierten Auxinbiosynthese schließen lässt.
Gewebespezifische und entwicklungsabhängige Studien anhand von Transkriptquantifizierungen, Analyse der Promotoraktivitäten und phänotypischen Untersuchun-

gen von Überexpressions- und Nullmutanten zeigten insbesondere eine Funktion von *YUC8* und *YUC9* in der Wurzel-, Blüten- und Samenentwicklung. Semiquantitative Transkriptvergleiche wiesen außerdem auf eine mögliche Regulation durch ARF-Transkriptionsfaktoren hin. Zudem gelang anhand von YUC8- und YUC9-GFP-Fusionskonstrukten erstmals eine eindeutig cytoplasmatische Lokalisierung sowie der Nachweis löslicher YUC-Proteine *in vivo*. *In-silico*-Analysen, Induktions- und Wurzelwuchsstudien sowie die Untersuchung der Überexpressionslinien einschließlich Lignin-bestimmung deuteten zusätzlich auf einen *YUC8*- und *YUC9*-vermittelten Zusammenhang zwischen Auxin und dem gasförmigen Phytohormon Ethylen hin.
Zusammenfassend beschreibt die vorliegende Arbeit die molekularen Mechanismen einer Octadecanoid-gesteuerten Auxinhomöostase durch *YUC8* und *YUC9*, mögliche regulatorische Rückkopplungsmechanismen sowie die Einordnung in den physiologischen Kontext pflanzlicher Entwicklung. Dabei liefert diese Arbeit neue Hypothesen zur kooperativen Wirkung von Octadecanoiden, Auxin und Ethylen *in planta*. Basierend auf diesen Erkenntnissen bietet sich ein breites Spektrum für eine weitergehende Forschung zur Charakterisierung der zugrunde liegenden Steuerungsmechanismen.

6 Summary

Auxins, with the main representative indole-3-acetic-acid (IAA, Auxin), are phytohormones involved in nearly all steps of plant development. The phytohormone group of the octadecanoids, like jasmonic acid (JA) and its precursor 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), play a major role in the stress response. Recently, it became evident that both groups of phytohormones share synergistic functions. Yet, a direct link between octadecanoids and auxins had not been reported. Using microarray studies with a JA- and OPDA-deficient *Arabidopsis thaliana* knock-out mutant, two genes called *YUC8* and *YUC9* were found to be induced by addition of octadecanoids. Characterization of *YUC*-homologous genes implicated a role of these genes in the biosynthesis of auxins.
In this study, *YUC8* and *YUC9* were characterized using genetic and biomolecular approaches to reveal the mechanisms of an octadecanoid-induced biosynthesis of auxins. Therefore, stable overexpression mutants of both genes were obtained with the help of three different expression systems. Additionally, promoter activities of both genes were analyzed by transgenic GUS reporter gene lines. The physiologic impact of *YUC8* and *YUC9* was further investigated using single and double knock-out mutants.
Increased auxin contents in *YUC8* and *YUC9* gain-of-function lines were confirmed using GC-MS/MS techniques and phenotypic analyses. Overexpression of *YUC8* and *YUC9* resulted in a typical auxin overproducer phenotype in *A. thaliana* and also in other plant species. This implicates a conserved reaction mechanism also among distant plant species. Furthermore, an involvement of both genes in a tryptophan-dependent pathway for auxin biosynthesis was demonstrated.
Quantitative real-time PCR studies and analyses of promoter-GUS reporter gene fusions revealed a COI1-dependent induction of *YUC9* by methyl jasmonate (MeJA), coronatin, and, to a minor extend, by OPDA. Additionally, *YUC9* was shown to be induced by mechanical injury. The auxin content of wildtype plants is increased by addition of MeJA. The increase of auxin levels was reduced slightly in *yuc8* and *yuc9* single knock-out mutants, but the *yuc8/yuc9* double mutant showed a significantly reduced shift of auxin levels after addition of MeJA. That implicates a functional redundancy for *YUC8* and *YUC9* within the MeJA-induced biosynthesis of auxin.
Using tissue- and development-specific qRT-PCR studies, analysis of promoter activities, and phenotypic characterizations of gain- or loss-of function lines, a distinct role of *YUC8* and *YUC9* in the development of roots, flowers, and seeds was discovered. A regulation of both genes by ARF transcriptional regulators was implicated by semi-

quantitative PCR. For the first time, the exclusively cytoplasmic *in-vivo*-localization and the expression of soluble YUC proteins was observed using YUC8- and YUC9-GFP fusions. The combination of *in-silico*-analyses, induction studies as well as the analyses of e.g. root growth and lignin contents of overexpression lines indicates a *YUC8*- and *YUC9*-mediated interplay between auxin and the gaseous phytohormone ethylene.
In summary, this PhD-thesis describes the so far unknown molecular mechanisms of an octadecanoid-controlled auxin homeostasis by activity of *YUC8* and *YUC9*. This work outlines putative regulatory feedback-loops and their physiologic importance for the complex coordination of plant development. Thereby, this thesis gives new insights into a cooperative function of the three phytohormones octadecanoids, auxins and ethylene *in planta*. Based on this thesis, the detailed characterization of the underlying regulatory mechanisms offers an interesting perspective for future research.

Literaturverzeichnis

[1] ABEL S, THEOLOGIS A (1996): Early genes and auxin action. *Plant Physiol* 111, 9–17.

[2] ABEL S, OELLER PW, THEOLOGIS A (1994): Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 326–30.

[3] ABEL S, NGUYEN MD, CHOW W, THEOLOGIS A (1995): *ACS4*, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin. *J Biol Chem* 270, 19093–9.

[4] ADLER E, BJÖRKQVIST KJ, HÄGGROTH S (1948): Über die Ursache der Farbreaktionen des Holzes. *Acta Chem Scan* 2, 93–4.

[5] AGI (2000): *Arabidopsis* Genome Initiative: analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.

[6] ALFIERI A, MALITO E, ORRU R, FRAAIJE MW, MATTEVI A (2008): Revealing the moonlighting role of NADP in the structure of a flavin-containing monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6572–7.

[7] ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–402.

[8] ALVAREZ JP, GOLDSHMIDT A, EFRONI I, BOWMAN JL, ESHED Y (2009): The *NGATHA* distal organ development genes are essential for style specification in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 1373–93.

[9] ALWEN A, MORENO RMB, VICENTE O, HEBERLE-BORS E (1992): Plant endogenous β-glucuronidase activity: how to avoid interference with the use of the *E. coli* β-glucuronidase as a reporter gene in transgenic plants. *Transgenic Res* 1, 63–70.

[10] AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMANN J, SMITH JA, STRUHL K: *Current protocols in molecular biology.* John Wiley & Sons, New York, 1995.

[11] AZADI H, HO P (2010): Genetically modified and organic crops in developing countries: a review of options for food security. *Biotechnol Adv* 28, 160–8.

[12] BADESCU GO, NAPIER RM (2006): Receptors for auxin: will it all end in TIRs? *Trends Plant Sci* 11, 217–23.

[13] BAGAVATHIANNAN M, VAN ACKER R (2009): Transgenes and national boundaries - The need for international regulation. *Environ Biosafety Res* 8, 141–8.

[14] BAINBRIDGE K, GUYOMARC'H S, BAYER E, SWARUP R, BENNETT M, MANDEL T, KUHLEMEIER C (2008): Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev* 22, 810–23.

[15] BAK S, TAX FE, FELDMANN KA, GALBRAITH DW, FEYEREISEN R (2001): CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 101–11.

[16] BALANZÁ V, NAVARRETE M, TRIGUEROS M, FERRÁNDIZ C (2006): Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. *J Exp Bot* 57, 3457–69.

[17] BARI R, JONES JDG (2009): Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69, 473–88.

[18] BARLIER I, KOWALCZYK M, MARCHANT A, LJUNG K, BHALERAO R, BENNETT M, SANDBERG G, BELLINI C (2000): The *SUR2* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14819–24.

[19] BASSFORD PJ, SILHAVY TJ, BECKWITH JR (1979): Use of gene fusion to study secretion of maltose-binding protein into *Escherichia coli* periplasm. *J Bacteriol* 139, 19–31.

[20] BÄURLE I, DEAN C (2006): The timing of developmental transitions in plants. *Cell* 125, 655–64.

[21] BEDOUELLE H, DUPLAY P (1988): Production in *Escherichia coli* and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. Export of the Klenow polymerase into the periplasmic space. *Eur J Biochem* 171, 541–9.

[22] BENDER CL, LIYANAGE H, PALMER D, ULLRICH M, YOUNG S, MITCHELL R (1993): Characterization of the genes controlling the biosynthesis of the polyketide phytotoxin coronatine including conjugation between coronafacic and coronamic acid. *Gene* 133, 31–8.

[23] BENDER CL, RANGASWAMY V, LOPER J (1999): Polyketide production by plant-associated pseudomonads. *Annu Rev Phytopathol* 37, 175–96.

[24] BENKOVÁ E, MICHNIEWICZ M, SAUER M, TEICHMANN T, SEIFERTOVÁ D, JÜRGENS G, FRIML J (2003): Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591–602.

[25] BENNETT MJ, MARCHANT A, GREEN HG, MAY ST, WARD SP, MILLNER PA, WALKER AR, SCHULZ B, FELDMANN KA (1996): *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273, 948–50.

[26] BERGER B, STRACKE R, YATUSEVICH R, WEISSHAAR B, FLÜGGE UI, GIGOLASHVILI T (2007): A simplified method for the analysis of transcription factor-promoter interactions that allows high-throughput data generation. *Plant J* 50, 911–6.

[27] BERLYN MB, LAST RL, FINK GR (1989): A gene encoding the tryptophan synthase β subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4604–8.

[28] BERNARD P, COUTURIER M (1992): Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 226, 735–45.

[29] BERTELL G, BOLANDER E, ELIASSON L (1990): Factors increasing ethylene production enhance the sensitivity of root growth to auxins. *Physiol Plant* 79, 255–8.

[30] BEVAN M, WALSH S (2005): The *Arabidopsis* genome: a foundation for plant research. *Genome Res* 15, 1632–42.

[31] BIESGEN C, WEILER EW (1999): Structure and regulation of *OPR1* and *OPR2*, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10,11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 208, 155–65.

[32] BINNS AN, THOMASHOW MF (1988): Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annu Rev Microbiol* 42, 575–606.

[33] BIRNBOIM HC, DOLY J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513–23.

[34] BLECHERT S, BRODSCHELM W, HÖLDER S, KAMMERER L, KUTCHAN TM, MUELLER MJ, XIA ZQ, ZENK MH (1995): The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4099–105.

[35] BLECHERT S, BOCKELMANN C, FÜSSLEIN M, VON SCHRADER T, STELMACH B, NIESEL U, WEILER EW (1999): Structure-activity analyses reveal the existence of two separate groups of active octadecanoids in elicitation of the tendril-coiling response of *Bryonia dioica* JACQ. *Planta* 207, 470–9.

[36] BLOM N, GAMMELTOFT S, BRUNAK S (1999): Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294, 1351–62.

[37] BÖER E, STEINBORN G, KUNZE G, GELLISSEN G (2007): Yeast expression platforms. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 513–23.

[38] BOERJAN W, CERVERA MT, DELARUE M, BEECKMAN T, DEWITTE W, BELLINI C, CABOCHE M, VAN ONCKELEN H, VAN MONTAGU M, INZÉ D (1995): Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7, 1405–19.

[39] BOISNARD-LORIG C, COLON-CARMONA A, BAUCH M, HODGE S, DOERNER P, BANCHAREL E, DUMAS C, HASELOFF J, BERGER F (2001): Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell* 13, 495–509.

[40] BÖTTCHER C (2007): Untersuchungen zur Biologie freier und lipidgebundener Phytodiensäuren. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.

[41] BÖTTCHER C, POLLMANN S (2009): Plant oxylipins: plant responses to 12-oxophytodienoic acid are governed by its specific structural and functional properties. *FEBS J* 276, 4693–704.

[42] BOUCHÉ N, BOUCHEZ D (2001): *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Curr Opin Plant Biol* 4, 111–7.

[43] BOURQUIN M, PILET PE (1990): Effect of zeatin on the growth and indolyl-3-acetic acid and abscisic acid levels in maize roots. *Physiol Plant* 80, 342–9.

[44] BRADFORD MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–54.

[45] BRADY SM, PROVART NJ (2009): Web-queryable large-scale data sets for hypothesis generation in plant biology. *Plant Cell* 21, 1034–51.

[46] BRESLAUER KJ, FRANK R, BLÖCKER H, MARKY LA (1986): Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3746–50.

[47] BRETTHAUER RK, CASTELLINO FJ (1999): Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol Appl Biochem* 30, 193–200.

[48] BROWSE J (2009): Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol* 60, 183–205.

[49] BRUCE RJ, WEST CA (1989): Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol* 91, 889–97.

[50] BRUCE WB, CHRISTENSEN AH, KLEIN T, FROMM M, QUAIL PH (1989): Photoregulation of a phytochrome gene promoter from oat transferred into rice by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9692–6.

[51] BULLOCK WO, FERNANDEZ JM, SHORT JM (1987): XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376–9.

[52] BULMER M (1987): Coevolution of codon usage and transfer RNA abundance. *Nature* 325, 728–30.

[53] CALVIN NM, HANAWALT PC (1988): High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170, 2796–801.

[54] CAMPANONI P, NICK P (2005): Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol* 137, 939–48.

[55] CAMPANONI P, BLASIUS B, NICK P (2003): Auxin transport synchronizes the pattern of cell division in a tobacco cell line. *Plant Physiol* 133, 1251–60.

[56] CASHMAN JR (1995): Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chem Res Toxicol* 8, 166–81.

[57] CECCHETTI V, ALTAMURA MM, FALASCA G, COSTANTINO P, CARDARELLI M (2008): Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* 20, 1760–74.

[58] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW, PRASHER DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–5.

[59] CHANDLER JW (2009): Auxin as compère in plant hormone crosstalk. *Planta* 231, 1–12.

[60] CHAUDHURY AM, MING L, MILLER C, CRAIG S, DENNIS ES, PEACOCK WJ (1997): Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4223–8.

[61] CHAVADEJ S, BRISSON N, MCNEIL JN, DE LUCA V (1994): Redirection of tryptophan leads to production of low indole glucosinolate canola. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2166–70.

[62] CHEN Z, AGNEW JL, COHEN JD, HE P, SHAN L, SHEEN J, KUNKEL BN (2007): *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20131–6.

[63] CHENG Y, DAI X, ZHAO Y (2006): Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 20, 1790–9.

[64] CHENG Y, ZHAO Y (2007): A role for auxin in flower development. *J Integr Plant Biol* 49, 99–104.

[65] CHENG Y, DAI X, ZHAO Y (2007): Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2430–9.

[66] CHEONG YH, CHANG HS, GUPTA R, WANG X, ZHU T, LUAN S (2002): Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129, 661–77.

[67] CHEVALIER F, MARTIN O, ROFIDAL V, DEVAUCHELLE AD, BARTEAU S, SOMMERER N, ROSSIGNOL M (2004): Proteomic investigation of natural variation between *Arabidopsis* ecotypes. *Proteomics* 4, 1372–81.

[68] CHICO JM, CHINI A, FONSECA S, SOLANO R (2008): JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Curr Opin Plant Biol* 11, 486–94.

[69] CHINI A, FONSECA S, FERNÁNDEZ G, ADIE B, CHICO JM, LORENZO O, GARCÍA-CASADO G, LÓPEZ-VIDRIERO I, LOZANO FM, PONCE MR, MICOL JL, SOLANO R (2007): The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666–71.

[70] CHINI A, BOTER M, SOLANO R (2009): Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS J* 276, 4682–92.

[71] CHOLODNY N (1928): Beiträge zur hormonalen Theorie von Tropismen. *Planta* 6, 118–34.

[72] CIESIELSKI T: *Untersuchungen über die Abwärtskrümmung der Wurzel.* Bd. 1. R. Nischkowsky, Breslau, 1872.

[73] CLOUGH SJ, BENT AF (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735–43.

[74] COHEN JD, BANDURSKI RS (1982): Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu Rev Plant Physiol* 33, 403–30.

[75] COHEN JD, SLOVIN JP, HENDRICKSON AM (2003): Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci* 8, 197–9.

[76] COLÓN-CARMONA A, YOU R, HAIMOVITCH-GAL T, DOERNER P (1999): Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* 20, 503–8.

[77] COONEY TP, NONHEBEL HM (1991): Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: Measurement, mass-spectral identification and incorporation of ^2H from ^2H_2O into indole-3-acetic acid, L- and D-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. *Planta* 184, 368–76.

[78] COSTACURTA A, KEIJERS V, VANDERLEYDEN J (1994): Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol Genet Genomics* 243, 463–72.

[79] CREELMAN RA, MULLET JE (1997): Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48, 355–81.

[80] CREGG JM (2007): Introduction: distinctions between *Pichia pastoris* and other expression systems. *Methods Mol Biol* 389, 1–10.

[81] CREGG JM, TOLSTORUKOV I, KUSARI A, SUNGA J, MADDEN K, CHAPPELL T (2009): Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol* 463, 169–89.

[82] CZECHOWSKI T, STITT M, ALTMANN T, UDVARDI MK, SCHEIBLE WR (2005): Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139, 5–17.

[83] DAHLKE RI, LUETHEN H, STEFFENS B (2010): ABP1: an auxin receptor for fast responses at the plasma membrane. *Plant Signal Behav* 5, 1–3.

[84] DALY R, HEARN MTW (2005): Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* 18, 119–38.

[85] DARWIN C: *The power of movement in plants.* Kap. 9. John Murray, London, 1880.

[86] DAVIES PJ: *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Bd. 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004.

[87] DELKER C, RASCHKE A, QUINT M (2008): Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta* 227, 929–41.

[88] DEMAIN AL, VAISHNAV P (2009): Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27, 297–306.

[89] DEMOLE E, LEDERER E, MERCIER D (1962): Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant charactéristique de l'essence de jasmin. *Helv Chim Acta* 45, 645–85.

[90] DEVOTO A, TURNER JG (2003): Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Ann Bot* 92, 329–37.

[91] DEVOTO A, ELLIS C, MAGUSIN A, CHANG HS, CHILCOTT C, ZHU T, TURNER JG (2005): Expression profiling reveals *COI1* to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* 58, 497–513.

[92] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, ESTELLE M (2005): The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 441–5.

[93] DHONUKSHE P, TANAKA H, GOH T, EBINE K, MÄHÖNEN AP, PRASAD K, BLILOU I, GELDNER N, XU J, UEMURA T, CHORY J, UEDA T, NAKANO A, SCHERES B, FRIML J (2008): Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 456, 962–6.

[94] DINNENY JR, LONG TA, WANG JY, JUNG JW, MACE D, POINTER S, BARRON C, BRADY SM, SCHIEFELBEIN J, BENFEY PN (2008): Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. *Science* 320, 942–5.

[95] DITENGOU FA, TEALE WD, KOCHERSPERGER P, FLITTNER KA, KNEUPER I, NZIENGUI H, VAN DER GRAAFF E, PINOSA F, LI X, NITSCHKE R, LAUX T, PALME K (2008): Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18818–23.

[96] DOMBRECHT B, XUE GP, SPRAGUE SJ, KIRKEGAARD JA, ROSS JJ, REID JB, FITT GP, SEWELAM N, SCHENK PM, MANNERS JM, KAZAN K (2007): MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2225–45.

[97] DREHER K, CALLIS J (2007): Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann Bot* 99, 787–822.

[98] DUNLAP JR, BINZEL ML (1996): NaCI reduces indole-3-acetic acid levels in the roots of tomato plants independent of stress-induced abscisic acid. *Plant Physiol* 112, 379–84.

[99] DUPLAY P, BEDOUELLE H, FOWLER A, ZABIN I, SAURIN W, HOFNUNG M (1984): Sequences of the *malE* gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* 259, 10606–13.

[100] EHLERT B, SCHÖTTLER MA, TISCHENDORF G, LUDWIG-MÜLLER J, BOCK R (2008): The paramutated *SULFUREA* locus of tomato is involved in auxin biosynthesis. *J Exp Bot* 59, 3635–47.

[101] EKLÖF S, ASTOT C, BLACKWELL J, MORITZ T, OLSSON O, SANDBERG G (1997): Auxin-cytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol* 38, 225–35.

[102] EKLUND DM, STÅLDAL V, VALSECCHI I, CIERLIK I, ERIKSSON C, HIRATSU K, OHME-TAKAGI M, SUNDSTRÖM JF, THELANDER M, EZCURRA I, SUNDBERG E (2010): The *Arabidopsis thaliana* STYLISH1 protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis. *Plant Cell* 22, 349–63.

[103] ELLIS CM, NAGPAL P, YOUNG JC, HAGEN G, GUILFOYLE TJ, REED JW (2005): *AUXIN RESPONSE FACTOR1* and *AUXIN RESPONSE FACTOR2* regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 132, 4563–74.

[104] ENDRIZZI K, MOUSSIAN B, HAECKER A, LEVIN JZ, LAUX T (1996): The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J* 10, 967–79.

[105] ESWARAMOORTHY S, BONANNO JB, BURLEY SK, SWAMINATHAN S (2006): Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9832–7.

[106] EVAN GI, LEWIS GK, RAMSAY G, BISHOP JM (1985): Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610–6.

[107] EXPOSITO-RODRIGUEZ M, BORGES AA, BORGES-PEREZ A, HERNANDEZ M, PEREZ JA (2007): Cloning and biochemical characterization of *ToFZY*, a tomato gene encoding a flavin monooxygenase involved in a tryptophan-dependent auxin biosynthesis pathway. *J Plant Growth Regul* 26, 329–40.

[108] FACCHINI PJ, HUBER-ALLANACH KL, TARI LW (2000): Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry* 54, 121–38.

[109] FALKENSTEIN E, GROTH B, MITHÖFER A, WEILER EW (1991): Methyljasmonate and α-linolenic acid are potent inducers of tendril coiling. *Planta* 185, 316–22.

[110] FARMER EE, RYAN CA (1992): Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4, 129–34.

[111] FARMER EE, ALMÉRAS E, KRISHNAMURTHY V (2003): Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol* 6, 372–8.

[112] FARMER EE (2007): Plant biology: jasmonate perception machines. *Nature* 448, 659–60.

[113] FATTORINI L, FALASCA G, KEVERS C, ROCCA LM, ZADRA C, ALTAMURA MM (2009): Adventitious rooting is enhanced by methyl jasmonate in tobacco thin cell layers. *Planta* 231, 155–68.

[114] FERGUSON IB, MITCHELL RE (1985): Stimulation of ethylene production in bean leaf discs by the pseudomonad phytotoxin coronatine. *Plant Physiol* 77, 969–73.

[115] FERRÁNDIZ C, PELAZ S, YANOFSKY MF (1999): Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annu Rev Biochem* 68, 321–54.

[116] FEYS BJF, BENEDETTI CE, PENFOLD CN, TURNER JG (1994): *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 6, 751–9.

[117] FINER JJ, VAIN P, JONES MW, MCMULLEN MD (1992): Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep* 11, 323–8.

[118] FISCHER U, IKEDA Y, GREBE M (2007): Planar polarity of root hair positioning in *Arabidopsis*. *Biochem Soc Trans* 35, 149–51.

[119] FONSECA S, CHINI A, HAMBERG M, ADIE B, PORZEL A, KRAMELL R, MIERSCH O, WASTERNACK C, SOLANO R (2009): (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* 5, 344–50.

[120] FONSECA S, CHICO JM, SOLANO R (2009): The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr Opin Plant Biol* 12, 539–47.

[121] FRIEDMAN WE (2009): Auxin at the evo-devo intersection. *Science* 324, 1652–3.

[122] FRIML J, WISNIEWSKA J, BENKOVÁ E, MENDGEN K, PALME K (2002): Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415, 806–9.

[123] FU J, KEURENTJES JJB, BOUWMEESTER H, AMERICA T, VERSTAPPEN FWA, WARD JL, BEALE MH, VOS RCH de, DIJKSTRA M, SCHELTEMA RA, JOHANNES F, KOORNNEEF M, VREUGDENHIL D, BREITLING R, JANSEN RC (2009): System-wide molecular evidence for phenotypic buffering in *Arabidopsis*. *Nat Genet* 41, 166–7.

[124] FUJINO K, MATSUDA Y, OZAWA K, NISHIMURA T, KOSHIBA T, FRAAIJE MW, SEKIGUCHI H (2008): *NARROW LEAF 7* controls leaf shape mediated by auxin in rice. *Mol Genet Genomics* 279, 499–507.

[125] FUJIWARA T, MAISONNEUVE S, ISSHIKI M, MIZUTANI M, CHEN L, WONG HL, KAWASAKI T, SHIMAMOTO K (2010): *sekiguchi lesion* gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *J Biol Chem* 285, 11308–13.

[126] FUKAKI H, TASAKA M (2009): Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol* 69, 437–49.

[127] FUKAKI H, OKUSHIMA Y, TASAKA M (2007): Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int Rev Cytol* 256, 111–37.

[128] GALLAVOTTI A, BARAZESH S, MALCOMBER S, HALL D, JACKSON D, SCHMIDT RJ, MCSTEEN P (2008): *sparse inflorescence1* encodes a monocot-specific *YUCCA*-like gene required for vegetative and reproductive development in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15196–201.

[129] GÄLWEILER L, GUAN C, MÜLLER A, WISMAN E, MENDGEN K, YEPHREMOV A, PALME K (1998): Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282, 2226–30.

[130] GARCIA D, GERALD JNF, BERGER F (2005): Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 52–60.

[131] GELDNER N (2009): Cell polarity in plants: a PARspective on PINs. *Curr Opin Plant Biol* 12, 42–8.

[132] GFELLER A, LIECHTI R, FARMER EE (2006): *Arabidopsis* jasmonate signaling pathway. *Sci STKE* 2006, cm1.1–2.

[133] GFELLER A, DUBUGNON L, LIECHTI R, FARMER EE (2010): Jasmonate biochemical pathway. *Sci Signal* 3, cm3.1–7.

[134] GIBSON RA, SCHNEIDER EA, WIGHTMAN F (1972): Biosynthesis and metabolism of indol-3yl-acetic acid: II. *In vivo* experiments with ^{14}C-labelled precursors of IAA in tomato and barley shoots. *J Exp Bot* 23, 381–99.

[135] GLAZEBROOK J (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43, 205–27.

[136] GODA H, SAWA S, ASAMI T, FUJIOKA S, SHIMADA Y, YOSHIDA S (2004): Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134, 1555–73.

[137] GOETZ M, VIVIAN-SMITH A, JOHNSON SD, KOLTUNOW AM (2006): *AUXIN RESPONSE FACTOR8* is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1873–86.

[138] GOETZ M, HOOPER LC, JOHNSON SD, RODRIGUES JCM, VIVIAN-SMITH A, KOLTUNOW AM (2007): Expression of aberrant forms of *AUXIN RESPONSE FACTOR8* stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiol* 145, 351–66.

[139] GOODWIN PB: *Phytohormones and related compounds. A comprehensive treatise.* Bd. 2. Elsevier, Amsterdam, 1978.

[140] GOUGLER JA, EVANS ML (1981): Adaptation of corn roots to exogenously applied auxin. *Physiol Plant* 51, 394–8.

[141] GRAAFF E VAN DER, BOOT K, GRANBOM R, SANDBERG G, HOOYKAAS PJJ (2003): Increased endogenous auxin production in *Arabidopsis thaliana* causes both earlier described and novel auxin-related phenotypes. *J Plant Growth Regul* 22, 240–52.

[142] GRANT SG, JESSEE J, BLOOM FR, HANAHAN D (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4645–9.

[143] GRAY WM (2004): Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol* 2, e311.1–4.

[144] GREENBERG JT, YAO N (2004): The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6, 201–11.

[145] GRUBB CD, ZIPP BJ, LUDWIG-MÜLLER J, MASUNO MN, MOLINSKI TF, ABEL S (2004): *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant J* 40, 893–908.

[146] GRUNEWALD W, VANHOLME B, PAUWELS L, PLOVIE E, INZÉ D, GHEYSEN G, GOOSSENS A (2009): Expression of the *Arabidopsis* jasmonate signalling repressor *JAZ1/TIFY10A* is stimulated by auxin. *EMBO Rep* 10, 923–8.

[147] GUILFOYLE TJ, HAGEN G (2007): Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* 10, 453–60.

[148] GUILLET G, POUPART J, BASURCO J, DE LUCA V (2000): Expression of tryptophan decarboxylase and tyrosine decarboxylase genes in tobacco results in altered biochemical and physiological phenotypes. *Plant Physiol* 122, 933–43.

[149] GUSTAFSON FG (1937): Parthenocarpy induced by pollen extracts. *Am J Bot* 24, 102–7.

[150] GUTIERREZ L, BUSSELL JD, PACURAR DI, SCHWAMBACH J, PACURAR M, BELLINI C (2009): Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR* transcripts and microRNA abundance. *Plant Cell* 21, 3119–32.

[151] GUTJAHR C, RIEMANN M, MÜLLER A, DÜCHTING P, WEILER EW, NICK P (2005): Cholodny-Went revisited: a role for jasmonate in gravitropism of rice coleoptiles. *Planta* 222, 575–85.

[152] HAGEN G, GUILFOYLE T (2002): Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* 49, 373–85.

[153] HAN W, RONG H, ZHANG H, WANG MH (2009): Abscisic acid is a negative regulator of root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 695–700.

[154] HANAHAN D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–80.

[155] HARBORNE JB: *Introduction to ecological biochemistry.* 3. Aufl. Academic Press, London, 1988.

[156] HARMER SL, PANDA S, KAY SA (2001): Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 215–53.

[157] HARTLEY JL, TEMPLE GF, BRASCH MA (2000): DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res* 10, 1788–95.

[158] HATFIELD GW, ROTH DA (2007): Optimizing scaleup yield for protein production: computationally optimized DNA assembly (CODA) and translation engineering. *Biotechnol Annu Rev* 13, 27–42.

[159] HAY A, CRAFT J, TSIANTIS M (2004): Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? *Bioessays* 26, 395–404.

[160] HELLWIG S, DROSSARD J, TWYMAN RM, FISCHER R (2004): Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol* 22, 1415–22.

[161] HENTRICH M (2007): Untersuchungen zur Jasmonat-regulierten Auxinbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. Masterarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

[162] HIGO K, UGAWA Y, IWAMOTO M, KORENAGA T (1999): Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* 27, 297–300.

[163] HILSON P, SMALL I, KUIPER MTR (2003): European consortia building integrated resources for *Arabidopsis* functional genomics. *Curr Opin Plant Biol* 6, 426–9.

[164] HOUBEN A, ORFORD SJ, TIMMIS JN (2006): *In situ* hybridization to plant tissues and chromosomes. *Methods Mol Biol* 326, 203–18.

[165] HOWE GA, JANDER G (2008): Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* 59, 41–66.

[166] HOWE GA, SCHILMILLER AL (2002): Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr Opin Plant Biol* 5, 230–6.

[167] HRUZ T, LAULE O, SZABO G, WESSENDORP F, BLEULER S, OERTLE L, WIDMAYER P, GRUISSEM W, ZIMMERMANN P (2008): Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008, 420747.1–5.

[168] HU Z, FRITH M, NIU T, WENG Z (2003): SeqVISTA: a graphical tool for sequence feature visualization and comparison. *BMC Bioinformatics* 4, 1.1–8.

[169] HULL AK, VIJ R, CELENZA JL (2000): *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2379–84.

[170] ISHIGURO S, KAWAI-ODA A, UEDA J, NISHIDA I, OKADA K (2001): The *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCIENCE* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 2191–209.

[171] ISHIHARA A, HASHIMOTO Y, TANAKA C, DUBOUZET JG, NAKAO T, MATSUDA F, NISHIOKA T, MIYAGAWA H, WAKASA K (2008): The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant J* 54, 481–95.

[172] IVANCHENKO MG, MUDAY GK, DUBROVSKY JG (2008): Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55, 335–47.

[173] JACKSON RG, KOWALCZYK M, LI Y, HIGGINS G, ROSS J, SANDBERG G, BOWLES DJ (2002): Overexpression of an *Arabidopsis* gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *Plant J* 32, 573–83.

[174] JARVIS DL (2009): Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods Enzymol* 463, 191–222.

[175] JEFFERSON RA, KAVANAGH TA, BEVAN MW (1987): GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6, 3901–7.

[176] JENNY RJ, MANN KG, LUNDBLAD RL (2003): A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expr Purif* 31, 1–11.

[177] JOHNSON PR, ECKER JR (1998): The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu Rev Genet* 32, 227–54.

[178] JUNGHANS U, LANGENFELD-HEYSER R, POLLE A, TEICHMANN T (2004): Effect of auxin transport inhibitors and ethylene on the wood anatomy of poplar. *Plant Biol* 6, 22–9.

[179] KANG S, KANG K, LEE K, BACK K (2007): Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice. *Planta* 227, 263–72.

[180] KATSIR L, SCHILMILLER AL, STASWICK PE, HE SY, HOWE GA (2008): COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7100–5.

[181] KAWASHIMA T, GOLDBERG RB (2010): The suspensor: not just suspending the embryo. *Trends Plant Sci* 15, 23–30.

[182] KAZAN K, MANNERS JM (2008): Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol* 146, 1459–68.

[183] KAZAN K, MANNERS JM (2009): Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 14, 373–82.

[184] KELLER CP, VAN VOLKENBURGH E (1997): Auxin-induced epinasty of tobacco leaf tissues: a nonethylene-mediated response. *Plant Physiol* 113, 603–10.

[185] KEPINSKI S, LEYSER O (2005): The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 446–51.

[186] KEPINSKI S (2007): The anatomy of auxin perception. *Bioessays* 29, 953–6.

[187] KETSA S, WISUTIAMONKUL A, VAN DOORN WG (2006): Auxin is required for pollination-induced ovary growth in *Dendrobium* orchids. *Funct Plant Biol* 33, 887–92.

[188] KIEBER JJ, ROTHENBERG M, ROMAN G, FELDMANN KA, ECKER JR (1993): *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72, 427–41.

[189] KIEFFER M, NEVE J, KEPINSKI S (2010): Defining auxin response contexts in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 13, 12–20.

[190] KIM JI, SHARKHUU A, JIN JB, LI P, JEONG JC, BAEK D, LEE SY, BLAKESLEE JJ, MURPHY AS, BOHNERT HJ, HASEGAWA PM, YUN DJ, BRESSAN RA (2007): *yucca6*, a dominant

mutation in *Arabidopsis*, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes. *Plant Physiol* 145, 722–35.

[191] KING JJ, STIMART DP (1998): Genetic analysis of variation for auxin-induced adventitious root formation among eighteen ecotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. *J Hered* 89, 481–7.

[192] KNAUSS S, ROHRMEIER T, LEHLE L (2003): The auxin-induced maize gene *ZmSAUR2* encodes a short-lived nuclear protein expressed in elongating tissues. *J Biol Chem* 278, 23936–43.

[193] KNIGHT TA (1806): On the direction of the radicle and germen during the vegetation of seeds. *Philos Trans R Soc Lond* 96, 99–108.

[194] KNOX K, GRIERSON CS, LEYSER O (2003): *AXR3* and *SHY2* interact to regulate root hair development. *Development* 130, 5769–77.

[195] KOGA J (1995): Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1249, 1–13.

[196] KÖGL F, HAAGEN-SMIT J, ERXLEBEN H (1934): Über ein neues Auxin (Heteroauxin) aus Harn. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 228, 90–103.

[197] KONCZ C, SCHELL J (1986): The promoter of T_L-DNA gene *5* controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Genet Genomics* 204, 383–96.

[198] KONING RE (1983): The roles of auxin, ethylene, and acid growth in filament elongation in *Gaillardia grandiflora* (Asteraceae). *Am J Bot* 70, 602–10.

[199] KOO AJK, HOWE GA (2009): The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 70, 1571–80.

[200] KOO AJK, GAO X, JONES AD, HOWE GA (2009): A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J* 59, 974–86.

[201] KOSUGE T, HESKETT MG, WILSON EE (1966): Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid: I. The conversion of L-tryptophan to indole-3-acetamide by an enzyme system from *Pseudomonas savastanoi*. *J Biol Chem* 241, 3738–44.

[202] KRAMELL R, MIERSCH O, ATZORN R, PARTHIER B, WASTERNACK C (2000): Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the „oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiol* 123, 177–88.

[203] KRECEK P, SKUPA P, LIBUS J, NARAMOTO S, TEJOS R, FRIML J, ZAZÍMALOVÁ E (2009): The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol* 10, 249.1–11.

[204] KRUEGER SK, WILLIAMS DE (2005): Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol Ther* 106, 357–87.

[205] KUBIGSTELTIG I, LAUDERT D, WEILER EW (1999): Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta* 208, 463–71.

[206] KUPPUSAMY KT, WALCHER CL, NEMHAUSER JL (2009): Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Mol Biol* 69, 375–81.

[207] KUROMORI T, TAKAHASHI S, KONDOU Y, SHINOZAKI K, MATSUI M (2009): Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. *Plant Cell Physiol* 50, 1215–31.

[208] LAEMMLI UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–5.

[209] LAPLAZE L, BENKOVA E, CASIMIRO I, MAES L, VANNESTE S, SWARUP R, WEIJERS D, CALVO V, PARIZOT B, HERRERA-RODRIGUEZ MB, OFFRINGA R, GRAHAM N, DOUMAS P, FRIML J, BOGUSZ D, BEECKMAN T, BENNETT M (2007): Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* 19, 3889–900.

[210] LAREBEKE N VAN, ENGLER G, HOLSTERS M, VAN DEN ELSACKER S, ZAENEN I, SCHILPEROORT RA, SCHELL J (1974): Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169–70.

[211] LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ, HIGGINS DG (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–48.

[212] LAUDERT D, WEILER EW (1998): Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J* 15, 675–84.

[213] LEE DH, GOLDBERG AL (1998): Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8, 397–403.

[214] LEE S, SHARM Y, LEE TK, CHANG M, DAVIS KR (2001): Lignification induced by pseudomonads harboring avirulent genes on *Arabidopsis*. *Mol Cells* 12, 25–31.

[215] LEHMANN T (2009): Genetische und biochemische Charakterisierung von Schlüsselenzymen der Auxin-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.

[216] LEHMANN T, HOFFMANN M, HENTRICH M, POLLMANN S: Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: an ancient way of indole-3-acetic acid production? *Eur J Cell Biol*, eingereicht.

[217] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, MARCHAL K, MOREAU Y, VAN DE PEER Y, ROUZÉ P, ROMBAUTS S (2002): PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 30, 325–7.

[218] LEYSER HM, PICKETT FB, DHARMASIRI S, ESTELLE M (1996): Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the *SAUR-AC1* promoter. *Plant J* 10, 403–13.

[219] LEYSER O (2006): Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Curr Biol* 16, 424–33.

[220] LI H, JOHNSON P, STEPANOVA A, ALONSO JM, ECKER JR (2004): Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 7, 193–204.

[221] LI H, CHENG Y, MURPHY A, HAGEN G, GUILFOYLE TJ (2009): Constitutive repression and activation of auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149, 1277–88.

[222] LIM PO, LEE IC, KIM J, KIM HJ, RYU JS, WOO HR, NAM HG (2010): Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J Exp Bot* 61, 1419–30.

[223] LINCOLN C, BRITTON JH, ESTELLE M (1990): Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2, 1071–80.

[224] LIU CM, MEINKE DW (1998): The *titan* mutants of *Arabidopsis* are disrupted in mitosis and cell cycle control during seed development. *Plant J* 16, 21–31.

[225] LIU X, HUANG J, WANG Y, KHANNA K, XIE Z, OWEN HA, ZHAO D (2010): The role of *floral organs in carpels*, an *Arabidopsis* loss-of-function mutation in *MicroRNA160a*, uncovers its role in organogenesis and the mechanism regulating its expression. *Plant J*. Online-Publikation vor Drucklegung.

[226] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25, 402–8.

[227] LJUNG K, HUL AK, KOWALCZYK M, MARCHANT A, CELENZA J, COHEN JD, SANDBERG G (2002): Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 50, 309–32.

[228] LJUNG K, HULL AK, CELENZA J, YAMADA M, ESTELLE M, NORMANLY J, SANDBERG G (2005): Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17, 1090–104.

[229] LONG J, BARTON MK (2000): Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Dev Biol* 218, 341–53.

[230] LONG JA, MOAN EI, MEDFORD JI, BARTON MK (1996): A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379, 66–9.

[231] LORENZO O, PIQUERAS R, SÁNCHEZ-SERRANO JJ, SOLANO R (2003): ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15, 165–78.

[232] LORENZO O, SOLANO R (2005): Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* 8, 532–40.

[233] LUCA V DE, CUTLER AJ (1987): Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 85, 1099–102.

[234] LUDWIG-MÜLLER J, EPSTEIN E (1991): Occurrence and *in vivo* biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiol* 97, 765–70.

[235] MACH J (2009): The jasmonate receptor: Protein modeling and photoaffinity labeling reveal that the CORONATINE INSENSITIVE1 protein binds jasmonoyl-isoleucine and coronatine. *Plant Cell* 21, 2192.

[236] MANO Y, NEMOTO K, SUZUKI M, SEKI H, FUJII I, MURANAKA T (2010): The *AMI1* gene family: indole-3-acetamide hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants. *J Exp Bot* 61, 25–32.

[237] MARSCH-MARTINEZ N, GRECO R, VAN ARKEL G, HERRERA-ESTRELLA L, PEREIRA A (2002): Activation tagging using the *En-I* maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129, 1544–56.

[238] MASUCCI JD, SCHIEFELBEIN JW (1996): Hormones act downstream of *TTG* and *GL2* to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 8, 1505–17.

[239] MEINKE DW, CHERRY JM, DEAN C, ROUNSLEY SD, KOORNNEEF M (1998): *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282, 662–82.

[240] MEMELINK J (2009): Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* 70, 1560–70.

[241] MENG Y, MA X, CHEN D, WU P, CHEN M (2010): MicroRNA-mediated signaling involved in plant root development. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 345–9.

[242] MEYER A, MIERSCH O, BÜTTNER C, DATHE W, SEMBDNER G (1984): Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J Plant Growth Regul* 3, 1–8.

[243] MEZZETTI B, LANDI L, PANDOLFINI T, SPENA A (2004): The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnol* 4, 4.1–10.

[244] MICHAEL TP, MOCKLER TC, BRETON G, MCENTEE C, BYER A, TROUT JD, HAZEN SP, SHEN R, PRIEST HD, SULLIVAN CM, GIVAN SA, YANOVSKY M, HONG F, KAY SA, CHORY J (2008): Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific *cis*-regulatory modules. *PLoS Genet* 4, e14.1–17.

[245] MICHALCZUK L, RIBNICKY DM, COOKE TJ, COHEN JD (1992): Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol* 100, 1346–53.

[246] MIGLIACCIO F, RAYLE DL (1989): Effect of asymmetric auxin application on *Helianthus* hypocotyl curvature. *Plant Physiol* 91, 466–8.

[247] MIKKELSEN MD, FULLER VL, HANSEN BG, NAFISI M, OLSEN CE, NIELSEN HB, HALKIER BA (2009): Controlled indole-3-acetaldoxime production through ethanol-induced expression of *CYP79B2*. *Planta* 229, 1209–17.

[248] MISHRA BS, SINGH M, AGGRAWAL P, LAXMI A (2009): Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. *PLoS One* 4, e4502.1–13.

[249] MITCHELL RE, YOUNG H (1978): Identification of a chlorosis-inducing toxin of *Pseudomonas glycinea* as coronatine. *Phytochemistry* 17, 2028–9.

[250] MITTLER R, BLUMWALD E (2010): Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annu Rev Plant Biol*. Online-Publikation vor Drucklegung.

[251] MOCKAITIS K, ESTELLE M (2004): Integrating transcriptional controls for plant cell expansion. *Genome Biol* 5, 245.1–4.

[252] MOCKAITIS K, ESTELLE M (2008): Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 55–80.

[253] MOCKLER TC, MICHAEL TP, PRIEST HD, SHEN R, SULLIVAN CM, GIVAN SA, MCENTEE C, KAY SA, CHORY J (2007): The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72, 353–63.

[254] MOORE TC: *Biochemistry and physiology of plant hormones.* 2. Aufl. Springer Verlag, Berlin, 1989.

[255] MORITA MT, TASAKA M (2004): Gravity sensing and signaling. *Curr Opin Plant Biol* 7, 712–8.

[256] MUELLER S, HILBERT B, DUECKERSHOFF K, ROITSCH T, KRISCHKE M, MUELLER MJ, BERGER S (2008): General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 768–85.

[257] MÜLLER A, WEILER EW (2000): IAA-synthase, an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (*S*)-tryptophan. *Biol Chem* 381, 679–86.

[258] MÜLLER A, DÜCHTING P, WEILER EW (2002): A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216, 44–56.

[259] MULLIS KB, FALOONA FA (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335–50.

[260] MURASHIGE T, SKOOG F (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473–97.

[261] MURCHIE EH, PINTO M, HORTON P (2009): Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. *New Phytol* 181, 532–52.

[262] MURRAY MG, THOMPSON WF (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 4321–5.

[263] MÜSE G, SCHINDLER T, BERGFELD R, RUEL K, JACQUET G, LAPIERRE C, SPETH V, SCHOPFER P (1997): Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta* 201, 146–59.

[264] MUTO H, WATAHIKI MK, NAKAMOTO D, KINJO M, YAMAMOTO KT (2007): Specificity and similarity of functions of the *Aux/IAA* genes in auxin signaling of *Arabidopsis* revealed by promoter-exchange experiments among *MSG2/IAA19*, *AXR2/IAA7*, and *SLR/IAA14*. *Plant Physiol* 144, 187–96.

[265] NAFISI M, GOREGAOKER S, BOTANGA CJ, GLAWISCHNIG E, OLSEN CE, HALKIER BA, GLAZEBROOK J (2007): *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell* 19, 2039–52.

[266] NAGPAL P, ELLIS CM, WEBER H, PLOENSE SE, BARKAWI LS, GUILFOYLE TJ, HAGEN G, ALONSO JM, COHEN JD, FARMER EE, ECKER JR, REED JW (2005): Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132, 4107–18.

[267] NAKAGAWA N, MORI H, YAMAZAKI K, IMASEKI H (1991): Cloning of a complementary DNA for auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and differential expression of the gene by auxin and wounding. *Plant Cell Physiol* 32, 1153–63.

[268] NAUR P, PETERSEN BL, MIKKELSEN MD, BAK S, RASMUSSEN H, OLSEN CE, HALKIER BA (2003): CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133, 63–72.

[269] NEGI S, IVANCHENKO MG, MUDAY GK (2008): Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55, 175–87.

[270] NEMHAUSER JL, HONG F, CHORY J (2006): Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126, 467–75.

[271] NIBAU C, GIBBS DJ, COATES JC (2008): Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytol* 179, 595–614.

[272] NISHIMURA T, NAKANO H, HAYASHI K, NIWA C, KOSHIBA T (2009): Differential downward stream of auxin synthesized at the tip has a key role in gravitropic curvature via TIR1/AFBs-mediated auxin signaling pathways. *Plant Cell Physiol* 50, 1874–85.

[273] OESTERGAARD L (2009): Don't 'leaf' now. The making of a fruit. *Curr Opin Plant Biol* 12, 36–41.

[274] OHAD N, MARGOSSIAN L, HSU YC, WILLIAMS C, REPETTI P, FISCHER RL (1996): A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5319–24.

[275] OKADA K, UEDA J, KOMAKI MK, BELL CJ, SHIMURA Y (1991): Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* 3, 677–84.

[276] OKUSHIMA Y, MITINA I, QUACH HL, THEOLOGIS A (2005): AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J* 43, 29–46.

[277] OKUSHIMA Y, OVERVOORDE PJ, ARIMA K, ALONSO JM, CHAN A, CHANG C, ECKER JR, HUGHES B, LUI A, NGUYEN D, ONODERA C, QUACH H, SMITH A, YU G, THEOLOGIS A (2005): Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *Plant Cell* 17, 444–63.

[278] OKUSHIMA Y, FUKAKI H, ONODA M, THEOLOGIS A, TASAKA M (2007): ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 118–30.

[279] OSTIN, ILIC, COHEN (1999): An *in vitro* system from maize seedlings for tryptophan-independent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Plant Physiol* 119, 173–8.

[280] PACIOREK T, ZAZÍMALOVÁ E, RUTHARDT N, PETRÁSEK J, STIERHOF YD, KLEINE-VEHN J, MORRIS DA, EMANS N, JÜRGENS G, GELDNER N, FRIML J (2005): Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435, 1251–6.

[281] PAGNUSSAT GC, ALANDETE-SAEZ M, BOWMAN JL, SUNDARESAN V (2009): Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science* 324, 1684–9.

[282] PALME K, DOVZHENKO A, DITENGOU FA (2006): Auxin transport and gravitational research: perspectives. *Protoplasma* 229, 175–81.

[283] PANDOLFINI T, MOLESINI B, SPENA A (2007): Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends Plant Sci* 12, 327–9.

[284] PARCHMANN S, GUNDLACH H, MUELLER MJ (1997): Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol* 115, 1057–64.

[285] PARK JH, HALITSCHKE R, KIM HB, BALDWIN IT, FELDMANN KA, FEYEREISEN R (2002): A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* 31, 1–12.

[286] PARK JY, KIM HJ, KIM J (2002): Mutation in domain II of IAA1 confers diverse auxin-related phenotypes and represses auxin-activated expression of *Aux/IAA* genes in steroid regulator-inducible system. *Plant J* 32, 669–83.

[287] PAUWELS L, MORREEL K, WITTE ED, LAMMERTYN F, MONTAGU M v., BOERJAN W, INZÉ D, GOOSSENS A (2008): Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1380–5.

[288] PAUWELS L, INZÉ D, GOOSSENS A (2009): Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends Plant Sci* 14, 87–91.

[289] PEREIRA-NETTO AB (2001): Effect of inhibitors of ethylene biosynthesis and signal transduction pathway on the multiplication of *in vitro*-grown *Hancornia speciosa*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 66, 1–7.

[290] PERET B, RYBEL BD, CASIMIRO I, BENKOVÁ E, SWARUP R, LAPLAZE L, BEECKMAN T, BENNETT MJ (2009): *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* 14, 399–408.

[291] PETRÁSEK J, FRIML J (2009): Auxin transport routes in plant development. *Development* 136, 2675–88.

[292] PFAFFL MW (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 01, 92–5.

[293] PIERIK R, SASIDHARAN R, VOESENEK LACJ (2007): Growth control by ethylene: adjusting phenotypes to the environment. *J Plant Growth Regul* 26, 188–200.

[294] PIOTROWSKI M (2008): Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry* 69, 2655–67.

[295] POETHIG RS, PERAGINE A, YOSHIKAWA M, HUNTER C, WILLMANN M, WU G (2006): The function of RNAi in plant development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, 165–70.

[296] POLLMANN S (2002): Untersuchungen zur tryptophanabhängigen Indol-3-essigsäure-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.

[297] POLLMANN S, MÜLLER A, WEILER EW (2006): Many roads lead to „auxin“: of nitrilases, synthases, and amidases. *Plant Biol* 8, 326–33.

[298] POLLMANN S, NEU D, LEHMANN T, BERKOWITZ O, SCHÄFER T, WEILER EW (2006): Subcellular localization and tissue specific expression of amidase 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224, 1241–53.

[299] POLLMANN S, NEU D, WEILER EW (2003): Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 62, 293–300.

[300] POLLMANN S, DÜCHTING P, WEILER EW (2009): Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry* 70, 523–31.

[301] POZO JC DEL, LOPEZ-MATAS MA, RAMIREZ-PARRA E, GUTIERREZ C (2005): Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiol Plant* 123, 173–83.

[302] PRASAD TK, CLINE MG (1987): Shoot inversion inhibition of stem elongation in *Pharbitis nil*: a possible role for ethylene-induced glycoprotein and lignin. *Plant Physiol* 85, 104–8.

[303] PRETTY J (2008): Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 447–65.

[304] QUINT M, GRAY WM (2006): Auxin signaling. *Curr Opin Plant Biol* 9, 448–53.

[305] QUITTENDEN LJ, DAVIES NW, SMITH JA, MOLESWORTH PP, TIVENDALE ND, ROSS JJ (2009): Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiol* 151, 1130–8.

[306] RAMAKERS C, RUIJTER JM, DEPREZ RHL, MOORMAN AFM (2003): Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339, 62–6.

[307] RAMPEY RA, LECLERE S, KOWALCZYK M, LJUNG K, SANDBERG G, BARTEL B (2004): A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiol* 135, 978–88.

[308] RANJEVA R, GRAZIANA A, MAZARS C (1999): Plant graviperception and gravitropism: a newcomer's view. *FASEB J* 13, 135–141.

[309] RASBAND W (2009): ImageJ: image processing and analysis in java, version 1.42. *National Institutes of Health, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/.*

[310] RAWAT R, SCHWARTZ J, JONES MA, SAIRANEN I, CHENG Y, ANDERSSON CR, ZHAO Y, LJUNG K, HARMER SL (2009): REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16883–8.

[311] REN C, PAN J, PENG W, GENSCHIK P, HOBBIE L, HELLMANN H, ESTELLE M, GAO B, PENG J, SUN C, XIE D (2005): Point mutations in *Arabidopsis Cullin1* reveal its essential role in jasmonate response. *Plant J* 42, 514–24.

[312] RHEE SY, BEAVIS W, BERARDINI TZ, CHEN G, DIXON D, DOYLE A, GARCIA-HERNANDEZ M, HUALA E, LANDER G, MONTOYA M, MILLER N, MUELLER LA, MUNDODI S, REISER L, TACKLIND J, WEEMS DC, WU Y, XU I, YOO D, YOON J, ZHANG P (2003): The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to *Arabidopsis* biology, research materials and community. *Nucleic Acids Res* 31, 224–8.

[313] RICHTER GL, MONSHAUSEN GB, KROL A, GILROY S (2009): Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. *Plant Physiol* 151, 1855–66.

[314] RIGGS P: *Expression and purification of maltose-binding protein fusions.* Kap. 16.6. Curr Protoc Cell Biol, 2001.

[315] ROBINS H, KRASNITZ M, LEVINE AJ (2008): The computational detection of functional nucleotide sequence motifs in the coding regions of organisms. *Exp Biol Med* 233, 665–73.

[316] ROCK KL, GRAMM C, ROTHSTEIN L, CLARK K, STEIN R, DICK L, HWANG D, GOLDBERG AL (1994): Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761–71.

[317] ROGERS HJ (2006): Programmed cell death in floral organs: how and why do flowers die? *Ann Bot* 97, 309–15.

[318] ROHILA JS, CHEN M, CERNY R, FROMM ME (2004): Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J* 38, 172–81.

[319] ROJO E, TITARENKO E, LEÓN J, BERGER S, VANCANNEYT G, SÁNCHEZ-SERRANO JJ (1998): Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 13, 153–65.

[320] ROMANO CP, COOPER ML, KLEE HJ (1993): Uncoupling auxin and ethylene effects in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 5, 181–9.

[321] ROMANO CP, ROBSON PR, SMITH H, ESTELLE M, KLEE H (1995): Transgene-mediated auxin overproduction in *Arabidopsis*: hypocotyl elongation phenotype and interactions with the *hy6-1* hypocotyl elongation and *axr1* auxin-resistant mutants. *Plant Mol Biol* 27, 1071–83.

[322] ROTHBAUER U, ZOLGHADR K, MUYLDERMANS S, SCHEPERS A, CARDOSO MC, LEONHARDT H (2008): A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics* 7, 282–9.

[323] ROTINO GL, PERRI E, ZOTTINI M, SOMMER H, SPENA A (1997): Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nat Biotechnol* 15, 1398–401.

[324] RUBINSTEIN B (2000): Regulation of cell death in flower petals. *Plant Mol Biol* 44, 303–18.

[325] RUBIO V, SHEN Y, SAIJO Y, LIU Y, GUSMAROLI G, DINESH-KUMAR SP, DENG XW (2005): An alternative tandem affinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation. *Plant J* 41, 767–78.

[326] RUBIO V, BUSTOS R, IRIGOYEN ML, CARDONA-LÓPEZ X, ROJAS-TRIANA M, PAZ-ARES J (2009): Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Mol Biol* 69, 361–73.

[327] RUIZ-FERRER V, VOINNET O (2009): Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol* 60, 485–510.

[328] SACHS J (1882): Stoff und Form der Pflanzenorgane. *Arb Bot Inst Würzburg* 2, 452–88.

[329] SACK FD (1997): Plastids and gravitropic sensing. *Planta* 203, 63–8.

[330] SALKOWSKI E (1885): Über das Verhalten der Skatolcarbonsäure im Organismus. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 9, 23–33.

[331] SAMBROOK J, RUSSELL DW: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. Aufl. Cold Spring Habour Laboratory Press, New York, 2001.

[332] SANDERS PM, LEE PY, BIESGEN C, BOONE JD, BEALS TP, WEILER EW, GOLDBERG RB (2000): The *Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12, 1041–61.

[333] SANTOS-MARASCHIN F DOS, MEMELINK J, OFFRINGA R (2009): Auxin-induced, SCF^{TIR1}-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant J* 59, 100–9.

[334] SASAKI Y, ASAMIZU E, SHIBATA D, NAKAMURA Y, KANEKO T, AWAI K, AMAGAI M, KUWATA C, TSUGANE T, MASUDA T, SHIMADA H, TAKAMIYA K, OHTA H, TABATA S (2001): Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res* 8, 153–61.

[335] SATOH S, ESASHI Y (1980): α-Aminoisobutyric acid: a probable competitive inhibitor of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Cell Physiol* 21, 939–49.

[336] SAVIDGE RA (1988): Auxin and ethylene regulation of diameter growth in trees. *Tree Physiol* 4, 401–14.

[337] SAYERS EW, BARRETT T, BENSON DA, BOLTON E, BRYANT SH, CANESE K, CHETVERNIN V, CHURCH DM, DICUCCIO M, FEDERHEN S, FEOLO M, GEER LY, HELMBERG W, KAPUSTIN Y, LANDSMAN D, LIPMAN DJ, LU Z, MADDEN TL, MADEJ T, MAGLOTT DR, MARCHLER-BAUER A, MILLER V, MIZRACHI I, OSTELL J, PANCHENKO A, PRUITT KD, SCHULER GD, SEQUEIRA E, SHERRY ST, SHUMWAY M, SIROTKIN K, SLOTTA D, SOUVOROV A, STARCHENKO G, TATUSOVA TA, WAGNER L, WANG Y, WILBUR WJ, YASCHENKO E, YE J (2010): Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 38, D5–16.

[338] SCANLON MJ (2003): The polar auxin transport inhibitor *N*-1-naphthylphthalamic acid disrupts leaf initiation, KNOX protein regulation, and formation of leaf margins in maize. *Plant Physiol* 133, 597–605.

[339] SCHALLER F, SCHALLER A, STINTZI A (2005): Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J Plant Growth Regul* 23, 179–99.

[340] SCHENCK D, CHRISTIAN M, JONES A, LÜTHEN H (2010): Rapid auxin-induced cell expansion and gene expression: a four-decade-old question revisited. *Plant Physiol* 152, 1183–5.

[341] SCHMID M, DAVISON TS, HENZ SR, PAPE UJ, DEMAR M, VINGRON M, SCHÖLKOPF B, WEIGEL D, LOHMANN JU (2005): A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* 37, 501–6.

[342] SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ (2008): Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* 3, 1101–8.

[343] SCHNEIDER EA, GIBSON RA, WIGHTMAN F (1972): Biosynthesis and metabolism of indol-3yl-acetic acid: I. The native indoles of barley and tomato shoots. *J Exp Bot* 23, 152–70.

[344] SCHRUFF MC, SPIELMAN M, TIWARI S, ADAMS S, FENBY N, SCOTT RJ (2006): The *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* 133, 251–61.

[345] SCHWABE WW, MILLS JJ (1981): Hormones and parthenocarpic fruit-set: a literature survey. *Hortic Abstr* 51, 661–98.

[346] SCOFIELD S, MURRAY JAH (2006): *KNOX* gene function in plant stem cell niches. *Plant Mol Biol* 60, 929–46.

[347] SEIDEL C, WALZ A, PARK S, COHEN JD, LUDWIG-MÜLLER J (2006): Indole-3-acetic acid protein conjugates: novel players in auxin homeostasis. *Plant Biol* 8, 340–5.

[348] SEKIMOTO H, SEO M, KAWAKAMI N, KOMANO T, DESLOIRE S, LIOTENBERG S, MARION-POLL A, CABOCHE M, KAMIYA Y, KOSHIBA T (1998): Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 39, 433–42.

[349] SEMBDNER G, PARTHIER B (1993): The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44, 569–89.

[350] SEO M, AKABA S, ORITANI T, DELARUE M, BELLINI C, CABOCHE M, KOSHIBA T (1998): Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing *superroot1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 116, 687–93.

[351] SHARP PM, COWE E, HIGGINS DG, SHIELDS DC, WOLFE KH, WRIGHT F (1988): Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Res* 16, 8207–11.

[352] SHISHOVA M, LINDBERG S (2010): A new perspective on auxin perception. *J Plant Physiol* 167, 417–22.

[353] SHORT JM, FERNANDEZ JM, SORGE JA, HUSE WD (1988): λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res* 16, 7583–600.

[354] SITTE P, WEILER EW, KADEREIT JW, BRESINSKY A, KÖRNER C: *Strasburger – Lehrbuch der Botanik.* 35. Aufl. Spektrum-Akademischer Verlag, Heidelberg, 2002.

[355] SKOOG F, MILLER CO (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* 54, 118–30.

[356] SMET ID, SIGNORA L, BEECKMAN T, INZÉ D, FOYER CH, ZHANG H (2003): An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J* 33, 543–55.

[357] SMITH DB, JOHNSON KS (1988): Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase. *Gene* 67, 31–40.

[358] SMITH MC, FURMAN TC, INGOLIA TD, PIDGEON C (1988): Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography: a new concept in affinity chromatography for recombinant proteins. *J Biol Chem* 263, 7211–5.

[359] SMITH RS, BAYER EM (2009): Auxin transport-feedback models of patterning in plants. *Plant Cell Environ* 32, 1258–71.

[360] SOOSAAR JLM, BURCH-SMITH TM, DINESH-KUMAR SP (2005): Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat Rev Microbiol* 3, 789–98.

[361] SOUTHERN EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503–17.

[362] SPLIVALLO R, FISCHER U, GÖBEL C, FEUSSNER I, KARLOVSKY P (2009): Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol* 150, 2018–29.

[363] SPOEL SH, DONG X (2008): Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* 3, 348–51.

[364] SREEKRISHNA K, BRANKAMP RG, KROPP KE, BLANKENSHIP DT, TSAY JT, SMITH PL, WIERSCHKE JD, SUBRAMANIAM A, BIRKENBERGER LA (1997): Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190, 55–62.

[365] STAALDAL V, SUNDBERG E (2009): The role of auxin in style development and apical-basal patterning of the *Arabidopsis thaliana* gynoecium. *Plant Signal Behav* 4, 83–5.

[366] STAM M, MOL JNM, KOOTER JM (1997): The silence of genes in transgenic plants. *Ann Bot* 79, 3–12.

[367] STASWICK PE (2008): JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci* 13, 66–71.

[368] STASWICK PE (2009): Plant hormone conjugation: a signal decision. *Plant Signal Behav* 4, 757–9.

[369] STASWICK PE (2009): The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiol* 150, 1310–21.

[370] STELMACH BA, MÜLLER A, WEILER EW (1999): 12-Oxo-phytodienoic acid and indole-3-acetic acid in jasmonic acid-treated tendrils of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry* 51, 187–92.

[371] STEPANOVA AN, HOYT JM, HAMILTON AA, ALONSO JM (2005): A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2230–42.

[372] STEPANOVA AN, ROBERTSON-HOYT J, YUN J, BENAVENTE LM, XIE DY, DOLEZAL K, SCHLERETH A, JÜRGENS G, ALONSO JM (2008): *TAA1*-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133, 177–91.

[373] STEVENS LH, BLOM TJM, VERPOORTE R (1993): Subcellular localization of tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase and strictosidine glucosidase in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* and *Tabernaemontana divaricata*. *Plant Cell Rep* 12, 573–6.

[374] STEWART JL, NEMHAUSER JL (2010): Do trees grow on money? Auxin as the currency of the cellular economy. *Cold Spring Harb Protoc* 2, a001420.1–13.

[375] STINTZI A, BROWSE J (2000): The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10625–30.

[376] STINTZI A, WEBER H, REYMOND P, BROWSE J, FARMER EE (2001): Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12837–42.

[377] STONE SL, CALLIS J (2007): Ubiquitin ligases mediate growth and development by promoting protein death. *Curr Opin Plant Biol* 10, 624–32.

[378] STRADER LC, BARTEL B (2008): A new path to auxin. *Nat Chem Biol* 4, 337–9.

[379] STUDIER FW (1973): Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J Mol Biol* 79, 237–48.

[380] SUGAWARA S, HISHIYAMA S, JIKUMARU Y, HANADA A, NISHIMURA T, KOSHIBA T, ZHAO Y, KAMIYA Y, KASAHARA H (2009): Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5430–5.

[381] SUGE H (1971): Stimulation of oat and rice mesocotyl growth by ethylene. *Plant Cell Physiol* 12, 831–7.

[382] SUN J, XU Y, YE S, JIANG H, CHEN Q, LIU F, ZHOU W, CHEN R, LI X, TIETZ O, WU X, COHEN JD, PALME K, LI C (2009): *Arabidopsis ASA1* Is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *Plant Cell* 21, 1495–511.

[383] SUZA WP, STASWICK PE (2008): The role of JAR1 in jasmonoyl-L-isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta* 227, 1221–32.

[384] SWARUP K, BENKOVÁ E, SWARUP R, CASIMIRO I, PÉRET B, YANG Y, PARRY G, NIELSEN E, SMET ID, VANNESTE S, LEVESQUE MP, CARRIER D, JAMES N, CALVO V, LJUNG K, KRAMER E, ROBERTS R, GRAHAM N, MARILLONNET S, PATEL K, JONES JDG, TAYLOR CG, SCHACHTMAN DP, MAY S, SANDBERG G, BENFEY P, FRIML J, KERR I, BEECKMAN T, LAPLAZE L, BENNETT MJ (2008): The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol* 10, 946–54.

[385] TABATA R, IKEZAKI M, FUJIBE T, AIDA M, TIAN C en, UENO Y, YAMAMOTO KT, MACHIDA Y, NAKAMURA K, ISHIGURO S (2010): *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 *KNOX* genes. *Plant Cell Physiol* 51, 164–75.

[386] TAKI N, SASAKI-SEKIMOTO Y, OBAYASHI T, KIKUTA A, KOBAYASHI K, AINAI T, YAGI K, SAKURAI N, SUZUKI H, MASUDA T, TAKAMIYA KI, SHIBATA D, KOBAYASHI Y, OHTA H (2005): 12-Oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139, 1268–83.

[387] TAN X, ZHENG N (2009): Hormone signaling through protein destruction: a lesson from plants. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, 223–7.

[388] TANIMOTO M, ROBERTS K, DOLAN L (1995): Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 8, 943–8.

[389] TAO Y, FERRER JL, LJUNG K, POJER F, HONG F, LONG JA, LI L, MORENO JE, BOWMAN ME, IVANS LJ, CHENG Y, LIM J, ZHAO Y, BALLARÉ CL, SANDBERG G, NOEL JP, CHORY J (2008): Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133, 164–76.

[390] THAIN SC, HALL A, MILLAR AJ (2000): Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Curr Biol* 10, 951–6.

[391] THIMANN KV (1935): On the plant growth hormone produced by *Rhizopus suinus*. *J Biol Chem* 109, 279–91.

[392] THIMANN KV (1958): Auxin activity of some indole derivatives. *Plant Physiol* 33, 311–21.

[393] THIMANN KV: *Hormone action in the whole life of plants.* 1. Aufl. University of Massachusetts Press, Amherst, 1977.

[394] THINES B, KATSIR L, MELOTTO M, NIU Y, MANDAOKAR A, LIU G, NOMURA K, HE SY, HOWE GA, BROWSE J (2007): JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature* 448, 661–5.

[395] TIAN CE, MUTO H, HIGUCHI K, MATAMURA T, TATEMATSU K, KOSHIBA T, YAMAMOTO KT (2004): Disruption and overexpression of *auxin response factor 8* gene of *Arabidopsis* affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition. *Plant J* 40, 333–43.

[396] TIAN Q, REED JW (1999): Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3* gene. *Development* 126, 711–21.

[397] TICHOPAD A, DZIDIC A, PFAFFL M (2002): Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency. *Biotechnol Lett* 24, 2053–6.

[398] TIRYAKI I, STASWICK PE (2002): An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiol* 130, 887–94.

[399] TITARENKO E, ROJO E, LEÓN J, SÁNCHEZ-SERRANO JJ (1997): Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 115, 817–26.

[400] TIWARI SB, WANG XJ, HAGEN G, GUILFOYLE TJ (2001): AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* 13, 2809–22.

[401] TIWARI SB, HAGEN G, GUILFOYLE T (2003): The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 15, 533–43.

[402] TOBEÑA-SANTAMARIA R, BLIEK M, LJUNG K, SANDBERG G, MOL JNM, SOUER E, KOES R (2002): FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes Dev* 16, 753–63.

[403] TOWBIN H, STAEHELIN T, GORDON J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4.

[404] TRIGUEROS M, NAVARRETE-GÓMEZ M, SATO S, CHRISTENSEN SK, PELAZ S, WEIGEL D, YANOFSKY MF, FERRÁNDIZ C (2009): The *NGATHA* genes direct style development in the *Arabidopsis* gynoecium. *Plant Cell* 21, 1394–409.

[405] TROMAS A, BRAUN N, MULLER P, KHODUS T, PAPONOV IA, PALME K, LJUNG K, LEE JY, BENFEY P, MURRAY JAH, SCHERES B, PERROT-RECHENMANN C (2009): The AUXIN BINDING PROTEIN 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. *PLoS One* 4, e6648.1–11.

[406] TSIANTIS M, HAY A (2003): Comparative plant development: the time of the leaf? *Nat Rev Genet* 4, 169–80.

[407] TURNER JG, ELLIS C, DEVOTO A (2002): The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14, 153–64.

[408] ULMASOV T, HAGEN G, GUILFOYLE TJ (1997): ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276, 1865–8.

[409] ULMASOV T, MURFETT J, HAGEN G, GUILFOYLE TJ (1997): Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963–71.

[410] ULMASOV T, HAGEN G, GUILFOYLE TJ (1999): Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5844–9.

[411] UN (2008): Population division of the department of economic and social affairs of the United Nations Secretariat. *World Population Prospects: The 2008 Revision, http://esa.un.org/unpp*.

[412] UPPALAPATI SR, AYOUBI P, WENG H, PALMER DA, MITCHELL RE, JONES W, BENDER CL (2005): The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *Plant J* 42, 201–17.

[413] VANCE CP, KIRK TK, SHERWOOD RT (1980): Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 18, 259–88.

[414] VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, research0034.1–11.

[415] VANNESTE S, FRIML J (2009): Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136, 1005–16.

[416] VELLOSILLO T, MARTÍNEZ M, LÓPEZ MA, VICENTE J, CASCÓN T, DOLAN L, HAMBERG M, CASTRESANA C (2007): Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* 19, 831–46.

[417] VICK BA, ZIMMERMAN DC (1987): Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiol* 85, 1073–8.

[418] VIERSTRA RD (2009): The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 385–97.

[419] VIETEN A, VANNESTE S, WISNIEWSKA J, BENKOVÁ E, BENJAMINS R, BEECKMAN T, LUSCHNIG C, FRIML J (2005): Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132, 4521–31.

[420] VIVIAN-SMITH A, KOLTUNOW AM (1999): Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpy in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 121, 437–51.

[421] VOGLER H, KUHLEMEIER C (2003): Simple hormones but complex signalling. *Curr Opin Plant Biol* 6, 51–6.

[422] VOINNET O, RIVAS S, MESTRE P, BAULCOMBE D (2003): An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33, 949–56.

[423] WALHOUT AJ, TEMPLE GF, BRASCH MA, HARTLEY JL, LORSON MA, VAN DEN HEUVEL S, VIDAL M (2000): GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol* 328, 575–92.

[424] WALTER M, CHABAN C, SCHÜTZE K, BATISTIC O, WECKERMANN K, NÄKE C, BLAZEVIC D, GREFEN C, SCHUMACHER K, OECKING C, HARTER K, KUDLA J (2004): Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40, 428–38.

[425] WANG Y, LI J (2008): Molecular basis of plant architecture. *Annu Rev Plant Biol* 59, 253–79.

[426] WASTERNACK C (2007): Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response growth and development. *Ann Bot* 100, 681–97.

[427] WASTERNACK C, KOMBRINK E (2010): Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chem Biol* 5, 63–77.

[428] WASTERNACK C, STENZEL I, HAUSE B, HAUSE G, KUTTER C, MAUCHER H, NEUMERKEL J, FEUSSNER I, MIERSCH O (2006): The wound response in tomato – role of jasmonic acid. *J Plant Physiol* 163, 297–306.

[429] WEBER H (2002): Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci* 7, 217–24.

[430] WEIJERS D, BENKOVA E, JÄGER KE, SCHLERETH A, HAMANN T, KIENTZ M, WILMOTH JC, REED JW, JÜRGENS G (2005): Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J* 24, 1874–85.

[431] WEILER EW (2003): Grundzüge der Sensorik Höherer Pflanzen. *Angew Chem* 115, 406–27.

[432] WEILER EW, ALBRECHT T, GROTH B, XIAA Z, LUXEM M, LISS H, ANDERT L, SPENGLER P (1993): Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry* 32, 591–600.

[433] WEILER EW, KUTCHAN TM, GORBA T, BRODSCHELM W, NIESEL U, BUBLITZ F (1994): The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Lett* 345, 9–13.

[434] WEINGART H, ULLRICH H, GEIDER K, VÖLKSCH B (2001): The role of ethylene production in virulence of *Pseudomonas syringae* pvs. *glycinea* and *phaseolicola*. *Phytopathology* 91, 511–8.

[435] WENT FW (1926): On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proc Kon Ned Akad Wet* 30, 10–9.

[436] WENT FW (1928): Wuchsstoff und Wachstum. *Recl Trav Bot Neerl* 25, 1–116.

[437] WIGHTMAN F, LIGHTY DL (1982): Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiol Plant* 55, 17–24.

[438] WILMOTH JC, WANG S, TIWARI SB, JOSHI AD, HAGEN G, GUILFOYLE TJ, ALONSO JM, ECKER JR, REED JW (2005): NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant J* 43, 118–30.

[439] WOLTERS H, JÜRGENS G (2009): Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet* 10, 305–17.

[440] WOO YM, PARK HJ, SU'UDI M, YANG JI, PARK JJ, BACK K, PARK YM, AN G (2007): Constitutively wilted 1, a member of the rice YUCCA gene family, is required for maintaining water homeostasis and an appropriate root to shoot ratio. *Plant Mol Biol* 65, 125–36.

[441] WOODWARD AW, BARTEL B (2005): Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 95, 707–35.

[442] WOODWARD C, BEMIS SM, HILL EJ, SAWA S, KOSHIBA T, TORII KU (2005): Interaction of auxin and ERECTA in elaborating *Arabidopsis* inflorescence architecture revealed by the activation tagging of a new member of the YUCCA family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiol* 139, 192–203.

[443] WU J, BALDWIN IT (2009): Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant Cell Environ* 32, 1161–74.

[444] WU L, UEDA T, MESSING J (1995): The formation of mRNA 3'-ends in plants. *Plant J* 8, 323–9.

[445] WU Z, IRIZARRY RA, GENTLEMAN R, MURILLO FM, SPENCER F (2004): A model based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *Johns Hopkins University, Dept. of Biostatistics Working Papers*. Online-Publikation vor Drucklegung.

[446] XIE DX, FEYS BF, JAMES S, NIETO-ROSTRO M, TURNER JG (1998): *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280, 1091–4.

[447] YAMAMOTO Y, KAMIYA N, MORINAKA Y, MATSUOKA M, SAZUKA T (2007): Auxin biosynthesis by the *YUCCA* genes in rice. *Plant Physiol* 143, 1362–71.

[448] YAN J, ZHANG C, GU M, BAI Z, ZHANG W, QI T, CHENG Z, PENG W, LUO H, NAN F, WANG Z, XIE D (2009): The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* 21, 2220–36.

[449] YANG TT, CHENG L, KAIN SR (1996): Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* 24, 4592–3.

[450] YANG WC, SHI DQ, CHEN YH (2010): Female gametophyte development in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol*. Online-Publikation vor Drucklegung.

[451] YANISCH-PERRON C, VIEIRA J, MESSING J (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–19.

[452] ZAMBRYSKI P, TEMPE J, SCHELL J (1989): Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* 56, 193–201.

[453] ZENSER N, ELLSMORE A, LEASURE C, CALLIS J (2001): Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11795–800.

[454] ZHANG Y, TURNER JG (2008): Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS One* 3, e3699.1–9.

[455] ZHAO Y, CHRISTENSEN SK, FANKHAUSER C, CASHMAN JR, COHEN JD, WEIGEL D, CHORY J (2001): A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291, 306–9.

[456] ZHAO Y, HULL AK, GUPTA NR, GOSS KA, ALONSO J, ECKER JR, NORMANLY J, CHORY J, CELENZA JL (2002): Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev* 16, 3100–12.

[457] ZHAO Y (2008): The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 11, 16–22.

[458] ZHAO Y (2008): The roles of *YUCCA* genes in auxin biosynthesis and plant development. *Molecular Functions of Botanical Systems.* Vortrag, SFB 480 Kongress, Bochum.

[459] ZHAO Y (2010): Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*. Online-Publikation vor Drucklegung.

[460] ZUO J, NIU QW, CHUA NH (2000): Technical advance: an estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* 24, 265–73.

Anhang

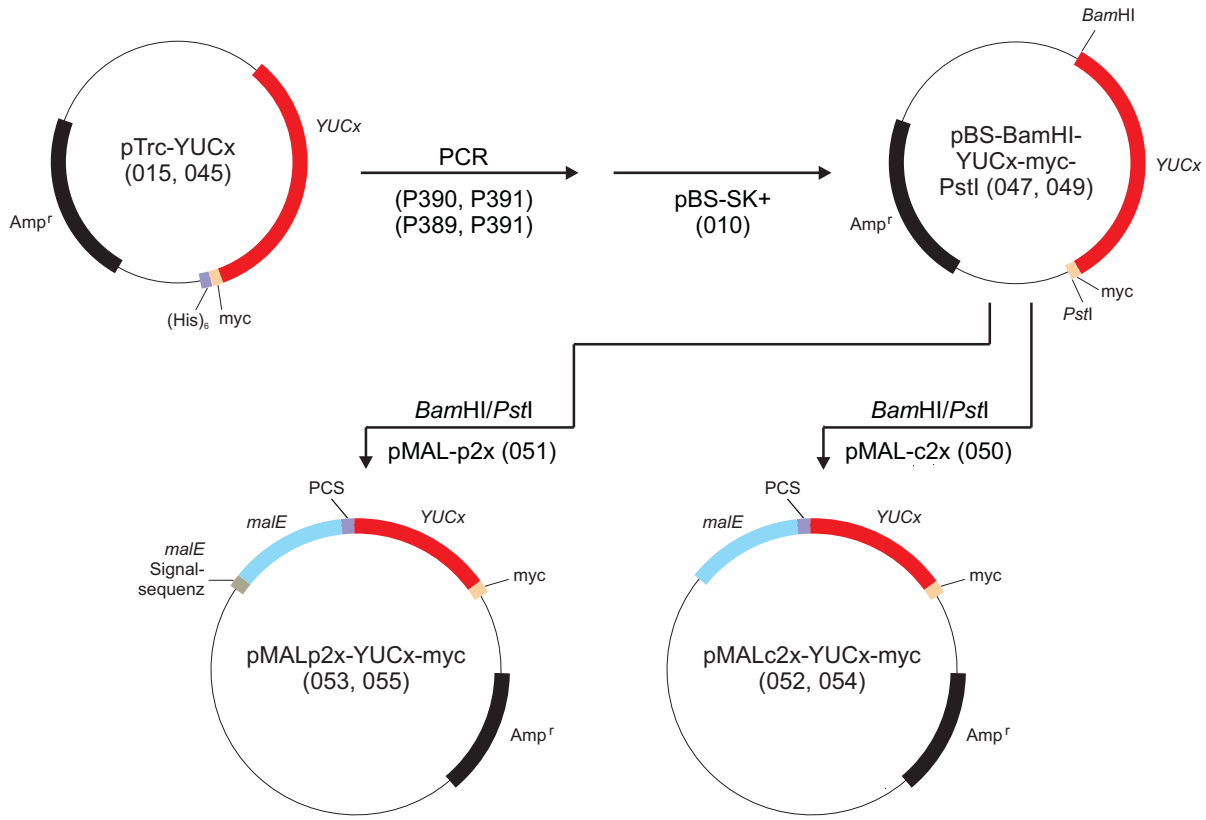


Abb. 6.1: Erstellung von Konstrukten zur Expression von MBP-Fusionsproteinen
Das Fragment BamHI-YUCx-myc-PstI wurde aus pTrc-YUCx amplifiziert und in pBS-SK+ eingebracht. Positiv sequenzierte Konstrukte wurden anschließend über *Bam*HI/*Pst*I in die Zielvektoren pMAL-p2x und pMAL-c2x eingebracht. *YUCx* steht für *YUC8* bzw. *YUC9*. Die Nummern entsprechen den Bezeichnungen der Plasmide (2.3.2) und Oligonukleotide (2.3.1). PCR (BamHI-YUCx-myc-PstI): 10 min, 94 °C; [30 s, 94 °C; 30 s, 58 °C; 80 s, 72 °C] × 30; 10 min, 72 °C (2.6.9).

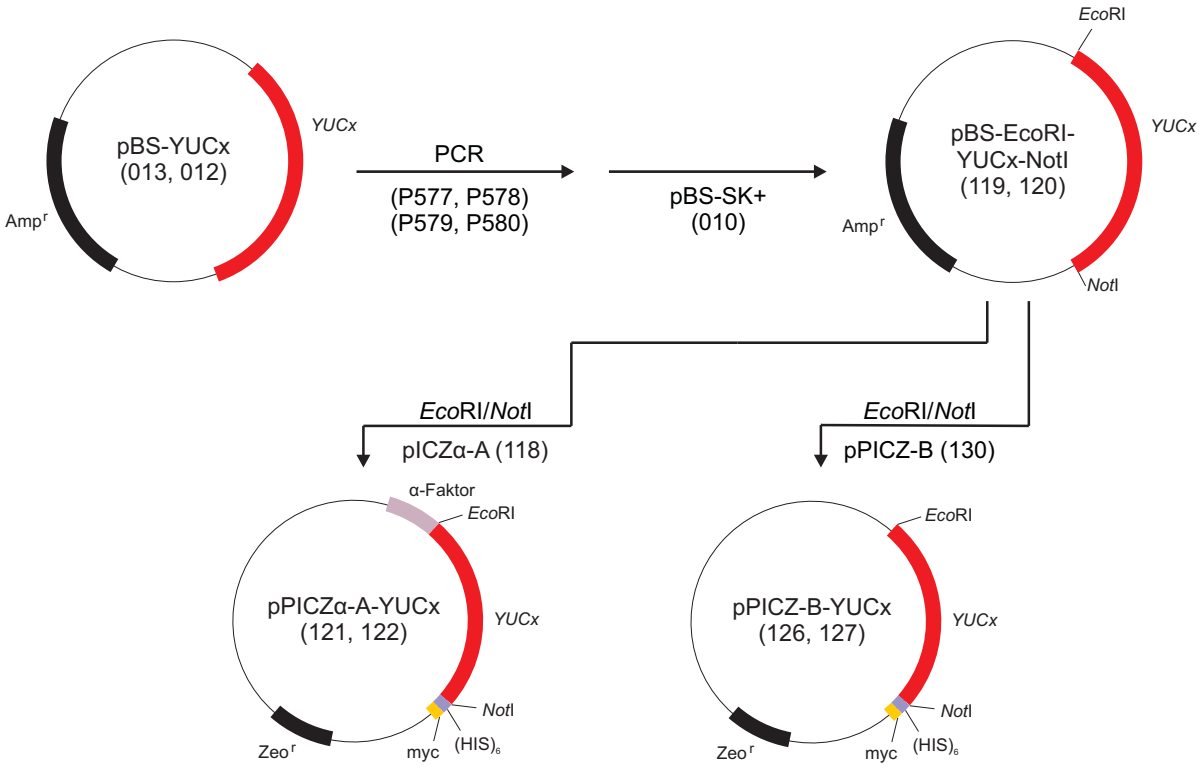


Abb. 6.2: Klonierungsstrategie für Überexpressionsstudien in *Pichia pastoris*
Das Fragment EcoRI-YUCx-NotI wurde aus pBS-YUCx amplifiziert und anschließend in den Sequenzierungsvektor pBS-SK+ kloniert. Nach Bestätigung der korrekten Sequenz erfolgte die Umklonierung über *Eco*RI/*Not*I in die Zielvektoren pPICZ*α* und pPICZ-B. *YUCx* steht für *YUC8* bzw. *YUC9*. Die Nummern entsprechen den Bezeichnungen der Plasmide (2.3.2) und Oligonukleotide (2.3.1). PCR (EcoRI-YUCx-NotI): 10 min, 94 °C; [30 s, 94 °C; 30 s, 58 °C; 80 s, 72 °C] × 30; 10 min, 72 °C (2.6.9).

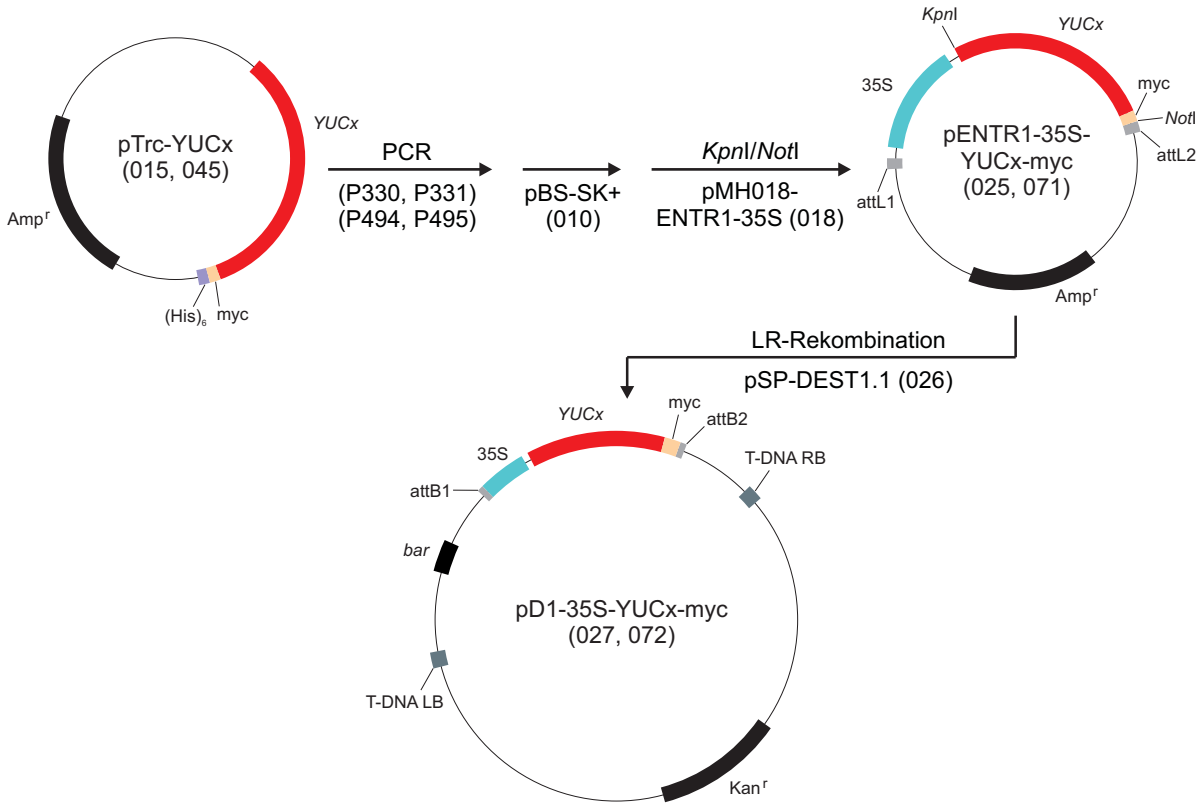


Abb. 6.3: Herstellung von Konstrukten zur konstitutiven Expression von *YUC8* und *YUC9* in Pflanzen

Ausgehend von pTrc-YUCx wurde KpnI-YUCx-myc-NotI mit geeigneten Oligonukleotiden amplifiziert und, nach Zwischenklonierung in den Sequenzierungsvektor pBS-SK+, über *Kpn*I/*Not*I in den Eingangsvektor pMH018-ENTR1-35S eingebracht. Positiv sequenzierte Konstrukte wurden anschließend per LR-Reaktion (2.6.2) mit dem Zielvektor pSP-DEST1.1 rekombiniert. *YUCx* steht für *YUC8* bzw. *YUC9*. Die Nummern entsprechen den Bezeichnungen der Plasmide (2.3.2) und Oligonukleotide (2.3.1). PCR (KpnI-YUCx-myc-NotI): 10 min, 94 °C; [30 s, 94 °C; 30 s, 58 °C; 80 s, 72 °C] × 30; 10 min, 72 °C (2.6.9).

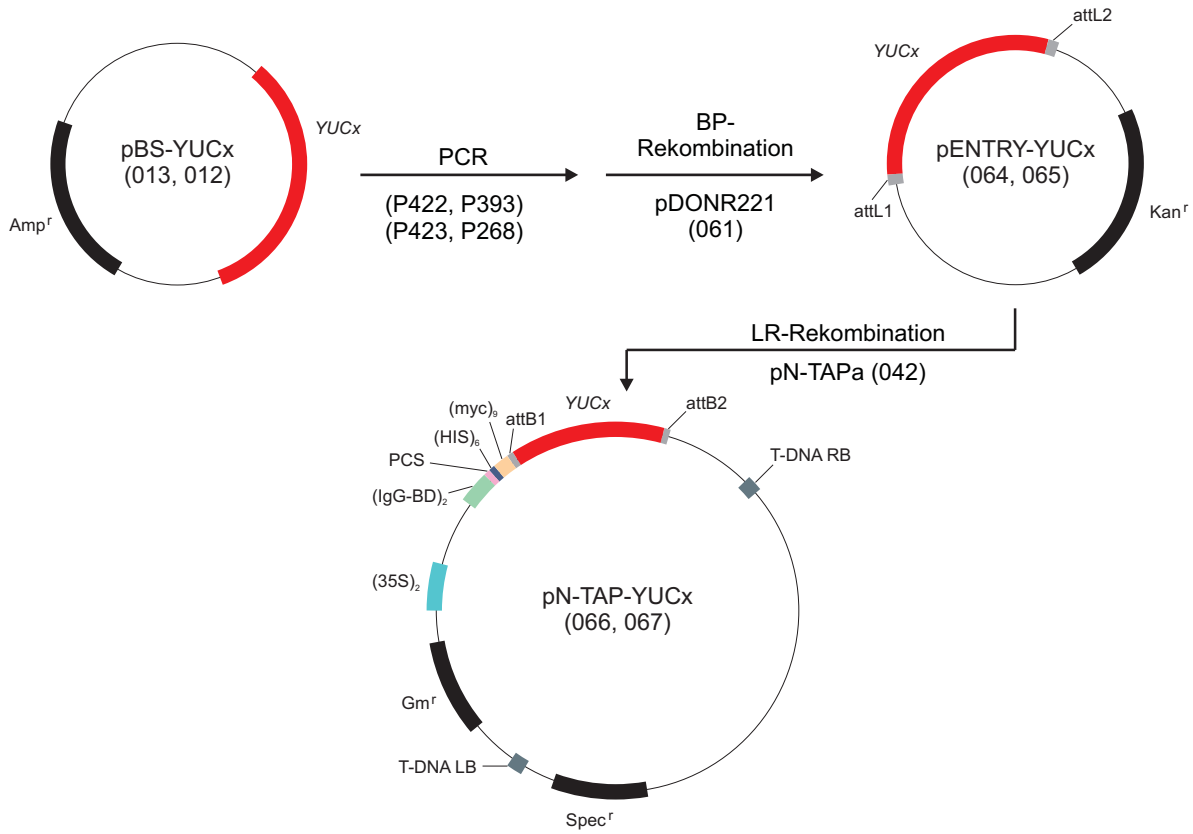


Abb. 6.4: Klonierungsstrategie zur Überexpression von TAP-markierten YUC8- und YUC9-Fusionsproteinen
Aus pBS-YUCx wurde das Fragment attB1-YUCx-attB2 amplifiziert und mittels BP-Rekombination (2.6.2) in den Eingangsvektor pENTRY-YUCx eingebracht. Nach Sequenzierung erfolgte eine LR-Rekombination mit dem Zielvektor pN-TAPa. *YUCx* steht für *YUC8* bzw. *YUC9*. Die Nummern entsprechen den Bezeichnungen der Plasmide (2.3.2) und Oligonukleotide (2.3.1). PCR (attB1-YUCx-attB2): 10 min, 94 °C; [30 s, 94 °C; 30 s, 58 °C; 90 s, 72 °C] × 30; 10 min, 72 °C (2.6.9).

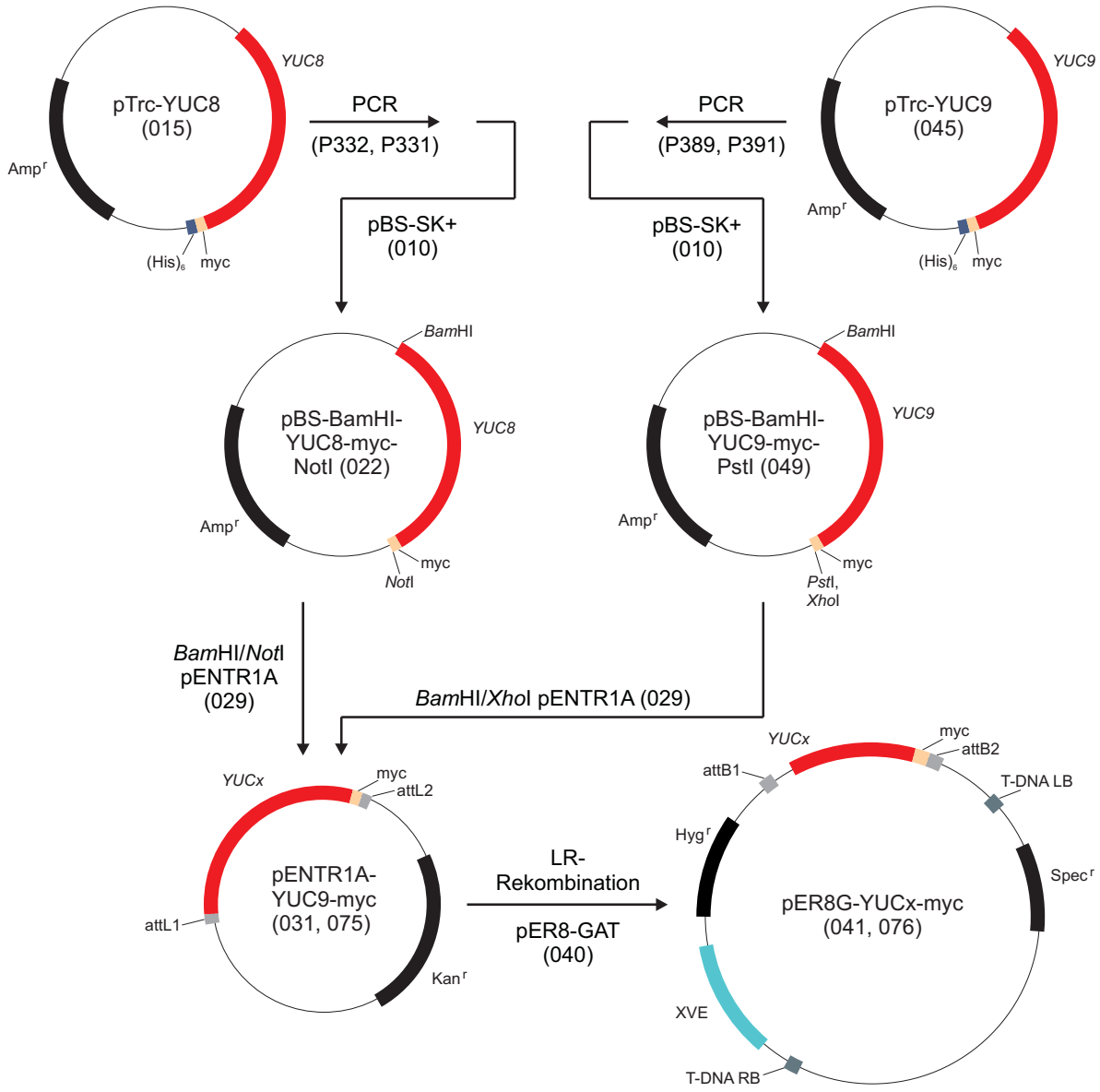


Abb. 6.5: Konstrukterstellung für eine induzierbare *YUC8*- und *YUC9*-Überexpression *in planta*

BamHI-YUC8-myc-NotI wurde mit geeigneten Oligonukleotiden aus pTrc-YUC8 amplifiziert und in den Sequenzierungsvektor pBS-SK+ eingebracht. Über *Bam*HI/*Not*I erfolgte die Umklonierung in den Eingangsvektor pENTR1A. Aus pTrc-YUC9 wurde BamHI-YUC9-myc-PstI amplifiziert, über *Bam*HI/*Pst*I in pBS-SK+ kloniert und darauf über *Bam*HI/*Xho*I in den Eingangsvektor pENTR1A eingebracht. Abschließend erfolgte die LR-Rekombination der Eingangsvektoren mit pER8-GAT (2.6.2). Die Nummern entsprechen den Bezeichnungen der Plasmide (2.3.2) und Oligonukleotide (2.3.1). PCR (BamHI-YUC8-myc-NotI und BamHI-YUC9-myc-PstI): 10 min, 94 °C; [30 s, 94 °C; 30 s, 58 °C; 80 s, 72 °C] × 30; 10 min, 72 °C (2.6.9).

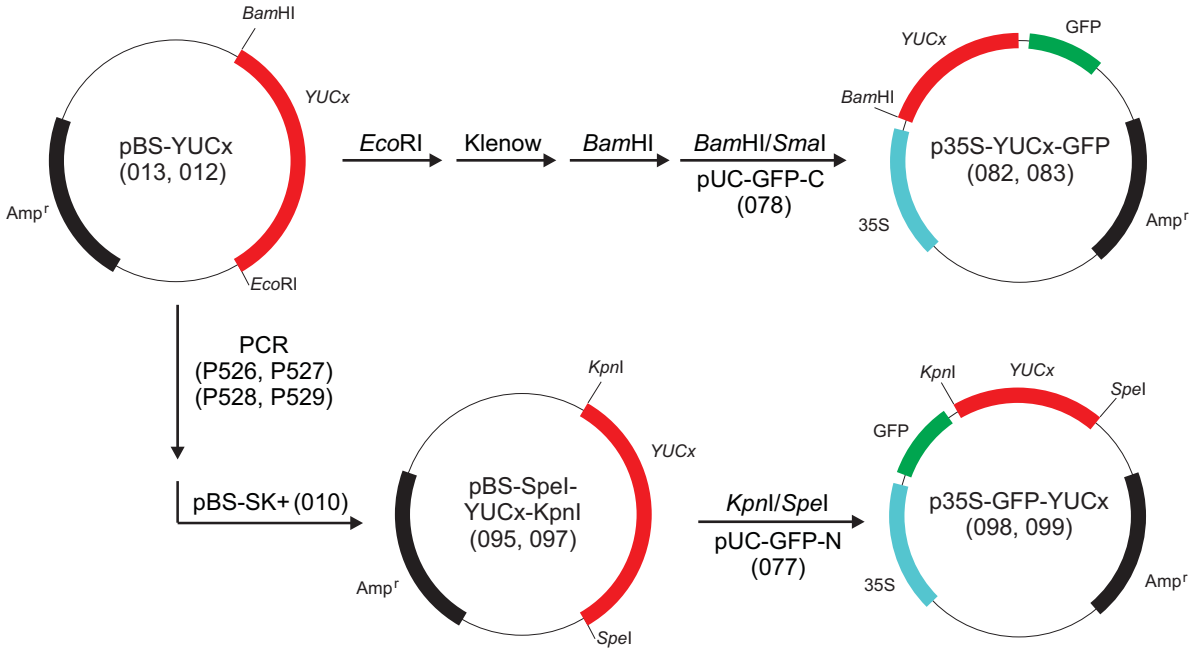


Abb. 6.6: Herstellung von Konstrukten zur subzellulären Lokalisation von N- und C-terminalen GFP-Fusionsproteinen
Zur Herstellung C-terminaler GFP-Fusionskonstrukte wurde pBS-YUCx mit *Eco*RI verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und anschließend mit *Bam*HI inkubiert (2.6.1). Daraufhin erfolgte die Klonierung über *Bam*HI/*Sma*I in pUC-GFP-C zur Konstruktion von p35S-YUCx-GFP. Für die Erstellung N-terminaler GFP-Fusionskonstrukte wurde aus pBS-YUCx das Fragment KpnI-YUCx-SpeI amplifiziert und in pBS-SK+ subkloniert. Nach Sequenzierung folgte die Umklonierung über *Kpn*I/*Spe*I in pUC-GFP-N, um p35S-GFP-YUCx zu erhalten. *YUCx* steht für *YUC8* bzw. *YUC9*. Die Nummern entsprechen den Bezeichnungen der Plasmide (2.3.2) und Oligonukleotide (2.3.1). PCR (KpnI-YUCx-SpeI): 10 min, 94 °C; [30 s, 94 °C; 30 s, 58 °C; 80 s, 72 °C] × 30; 10 min, 72 °C (2.6.9).

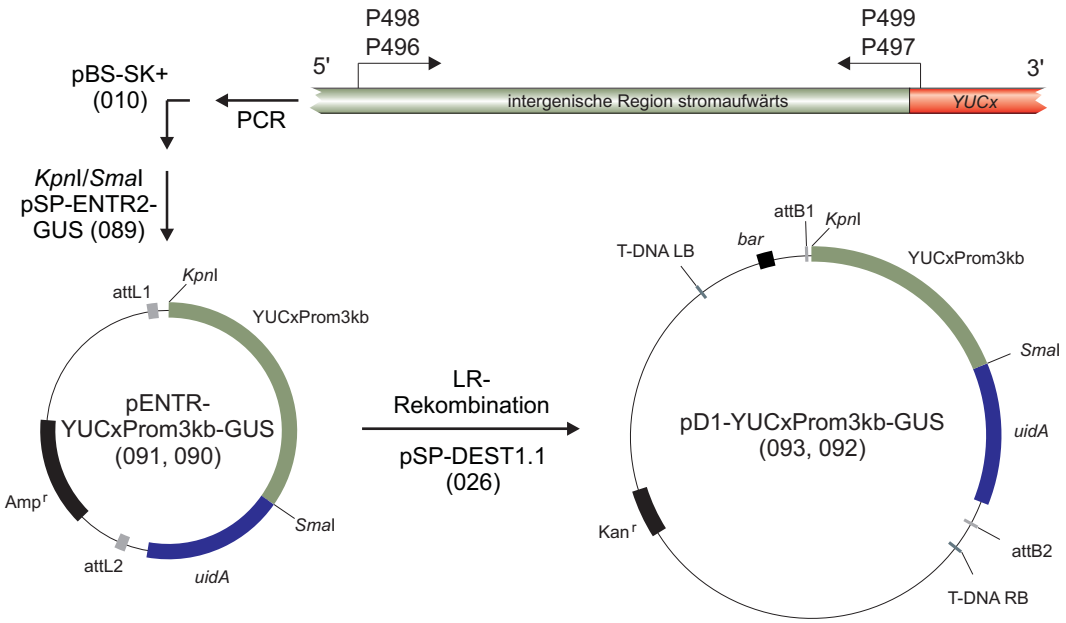


Abb. 6.7: Strategie zur Erstellung von Promotor-Reportergen-Konstrukten
Aus aufgearbeiteter *A.-thaliana*-DNA (2.6.5) wurden mittels iProof-Polymerase und spezifischer Oligonukleotide (2.3.1) 3000 bp der intergenischen Region stromaufwärts und die ersten sechs Codons von *YUCx* amplifiziert. Nach einer Zwischenklonierung in pBS-SK+ erfolgte über *Kpn*I/*Sma*I die Klonierung positiv sequenzierter Fragmente in den Eingangsvektor pSP-ENTR2-GUS und darauf aufbauend die LR-Rekombination (2.6.2) mit dem Zielvektor pSP-DEST1.1 zu pD1-YUCx-Prom3kb-GUS. *YUCx* steht für *YUC8* bzw. *YUC9*. Die Nummern entsprechen den Bezeichnungen der Plasmide (2.3.2) und Oligonukleotide (2.3.1). PCR (YUCxProm3kb): 0,5 min, 98 °C; [30 s, 98 °C; 30 s, 62 – 56 °C; 90 s, 72 °C] × 30; 10 min, 72 °C (2.6.9).

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht.

Vorträge:

Hentrich M, Böttcher C, Pollmann S (2008)
OPDA-mediated stress responses in *Arabidopsis thaliana*. Vortrag, 8th Cologne Minisymposium on Plant Biology, Köln, Deutschland

Hentrich M, Böttcher C, Zhao Y, Berkowitz O, Masle J, Pollmann S (2009)
Oxylipins contribute to the up-regulation of auxin biosynthesis. Vortrag, 4th European Symposium on Plant Lipids, Göttingen, Deutschland

Hentrich M (2009)
Kommunikation in Pflanzen: Eine direkte Verbindung zwischen pflanzlicher Abwehr und den Phytohormonen Auxin und Ethylen. Vortrag, Tagung „Natur und Wissenschaft" der Studienstiftung des deutschen Volkes, Berlin, Deutschland

Hentrich M, Böttcher C, Zhao Y, Berkowitz O, Masle J, Pollmann S (2009)
Oxylipins contribute to the transcriptional regulation of *YUC8* and *YUC9*, thereby controlling local auxin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Vortrag, 3rd International Symposium on Auxin and Cytokinin in Plant Development, Prag, Tschechische Republik

Hentrich M (2009)
Molekulare Tools zur *In-vivo*-Charakterisierung pflanzlicher Gene am Beispiel der Octadecanoid-regulierten Gene *YUCCA8* und *YUCCA9*. Vortrag, Tagung „Natur und Wissenschaft" der Studienstiftung des deutschen Volkes, Koppelsberg, Deutschland

Poster:

Hentrich M, Pollmann S (2008)
YUCCA8, an environmental stress-regulated member of the *YUCCA* gene family, affects flower development and induces ethylene production in *Arabidopsis thaliana*. Poster, Auxin 2008 Conference, Marrakesch, Marokko

Hentrich M, Pollmann S (2009)
Oxylipin-regulated *YUC8* and *YUC9* are involved in establishing an auxin-ethylene loop in *Arabidopsis*. Poster, International Symposium on Regulatory Oxylipins, Lausanne, Schweiz

Hentrich M, Zhao Y, Berkowitz O, Masle J, Pollmann S (2009)
Oxylipins contribute to the transcriptional regulation of *YUC8* and *YUC9*, thereby controlling local auxin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Poster, Botanikertagung, Leipzig, Deutschland

Hentrich M, Zhao Y, Pollmann S (2009)
Oxylipin-abhängige Induktion von Auxin- und Ethylen-Synthese. Poster, 22. Tagung Pflanzenmolekularbiologie, Dabringhausen, Deutschland

Hentrich M, Pollmann S (2009)
Oxylipin-regulated *YUC8* and *YUC9* are involved in establishing an auxin-ethylene loop in *Arabidopsis*. Poster (ausgezeichnet mit dem Posterpreis), 4th European Symposium on Plant Lipids, Göttingen, Deutschland

Publikationen:

Hentrich M, Böttcher C, Cheng Y, Zhao Y, Berkowitz O, Masle J, Pollmann S
Oxylipins modulate *YUCCA* gene expression to regulate jasmonate-dependent plant growth responses. *Plant Cell*, eingereicht

Publikationen neben dieser Arbeit:

Lehmann T, Hoffmann M, Hentrich M, Pollmann S
Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: an ancient way of indole-3-acetic acid production? *Eur J Cell Biol*, eingereicht

Lehmann T, Hoffmann M, Boij P, Frerigmann H, Hentrich M, Neu D, Töpel M, Jost R, Aronsson H, Pollmann S
Functional analysis of the *AMIDASE1* gene provides evidence for an operational indole-3-acetamide pathway of auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, eingereicht

Danksagung

Für die letzten Jahre möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stephan Pollmann bedanken. Die fruchtbaren Diskussionen, die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen sowie sein Vertrauen in meine Arbeit ermöglichten mir eine absolut freie Bearbeitung meines Themas. Weiterhin danke ich ihm, dass ich durch seine erfolgreiche Antragsstellung auch kostenintensive Versuche angehen durfte. Ohne sein Engagement, gerade in den Zeiten des Umbruchs, wäre die zügige Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen – dafür gilt ihm mein besonderer Dank.

Bei Prof. Dr. Franz Narberhaus bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und einige interessante Gespräche und Tipps. Ebenfalls danke ich ihm sehr für die Nutzung des „NanoDrops“ und sein fortwährendes Interesse an dieser Arbeit.

Prof. Dr. Elmar W. Weiler danke ich für die Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit und ganz besonders für seine motivierende Art, mich für die Pflanzenphysiologie zu begeistern.

Bei Prof. Dr. Danja Schünemann möchte ich mich für ihr Vertrauen in der Übergangsphase während des Wechsels der Lehrstuhlleitung bedanken.

Prof. Dr. Ulrich Kück und PD Dr. Minou Nowrousian danke ich für die Einweisung und Nutzung des „Real-Time-Cyclers“.

Vielen Dank an Prof. Dr. Yunde Zhao für die Bereitstellung des Nullmutanten-Saatguts.

Neben einem besonderen Dank an die Arbeitsgruppe „Auxin“ möchte ich mich auch bei der AG Schünemann, bei der AG Link, bei den anderen Lehrstuhlmitgliedern für die lehrreichen Jahre und vor allem bei Petra Düchting für die GC-MS/MS-Analysen bedanken. Für viele kleine Hilfen, das Ausprobieren neuer Methoden, das Beschaffen von Fachartikeln und/oder für die lustigen Abende bedanke ich mich sehr bei Dr. Christine Böttcher, Dr. Christine Richter, Claudia Gras, Dr. Daniel Neu, Daniel Bourquain, Daniel Passon, Daniela Huppenkothen, Hacer Türkeri, Henning Frerigmann, Dr. Jennifer Schweer, Jens Kortmann, Klaus Hagemann, Maik Hoffmann, Dr. Philipp Zerbe, Dr. Thomas Bals, Dr. Thomas Lehmann und Verena Effenberger.

Bei der Studienstiftung des deutschen Volkes bedanke ich mich neben der unkomplizierten finanziellen Förderung während meiner Promotion besonders für die ideelle Förderung und dafür, dass ich dadurch viele interessante Menschen kennenlernen durfte. Der Ruhr-University Research School danke ich für die finanzielle Unterstützung von Tagungen und wissenschaftlichem Equipment.

Ganz besonders möchte ich meiner lieben Familie danken, welche mir ausnahmslos Rückhalt gab und mich mit guten Ratschlägen unterstützte.

Zu guter Letzt gilt der größte Dank Sina Langklotz. Durch ihre liebevolle, geduldige, motivierende, kulinarische und auch fachliche Unterstützung hat sie erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Name:	Mathias Hentrich
Geboren:	19.04.1982 in Heilbad Heiligenstadt
Eltern:	Klaus-Martin und Maria Hentrich, geb. Freund
Familienstand:	ledig, keine Kinder
06/2001	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife, Nikolaus-Ehlen-Gymnasium, Velbert
10/2002 – 06/2005	Studium der Biologie, Ruhr-Universität Bochum
Abschluss:	Bachelor of Science (B. Sc.)
Bachelorarbeit:	„Untersuchungen zur Charakterisierung der Amidase 6, einem putativ chloroplastidären Mitglied der Amidase-Signatur-Familie in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.“ am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie (Prof. Dr. E. W. Weiler)
10/2005 – 03/2007	Studium der Biologie, Ruhr-Universität Bochum
Abschluss:	Master of Science (M. Sc.)
Masterarbeit:	„Untersuchungen zur Jasmonat-regulierten Auxinbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.“ am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie (Prof. Dr. E. W. Weiler)
seit 06/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie an der Ruhr-Universität Bochum und Promotion im Rahmen der Internationalen Graduiertenschule Biowissenschaften in der Projektgruppe von Prof. Dr. S. Pollmann mit dem Thema „Molekulare Mechanismen der Octadecanoid-regulierten Indol-3-essigsäure-Biosynthese“
seit 10/2007	Mitglied der Research School der Ruhr-Universität Bochum
seit 12/2007	Promotionsstipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes